

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin

**UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL
DES INDOMETHACINERIN AN DER ISOLIERT
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER
UND AN DER RATTE IN VIVO**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den
Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilonka Schuch
aus
Wuppertal

1903



Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin

**UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL
DES INDOMETHACINERIN AN DER ISOLIERT
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER
UND AN DER RATTE IN VIVO**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde an den
Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilonka Schuch
aus
Wuppertal



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin

UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL
DES INDOMETHACINERIN AN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN
RATTENLEBER UND AN DER RATTE IN VIVO

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilonka Schuch
aus Wuppertal

Referent: Prof.Dr.Dr.E. G e r h a r d s

Korreferent: Priv.Doz.Dr.J. R o o t s

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24.01.1983

Für
Renate Achterberg

INHALTSVERZEICHNIS

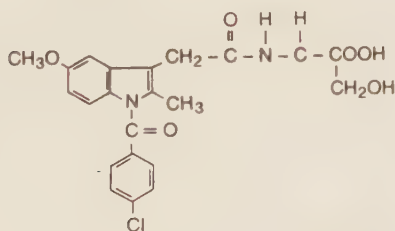
	Seite
1.0.0	Einleitung 8
2.0.0	Reagenzien und Geräte 16
3.0.0	Methodik 18
3.1.1	Herstellung des Fließmittel- systems für die Dünnschicht- chromatographie 18
3.1.2	Chromatographische Substanz- auftrennung 18
3.1.3	Biochemische Bestimmungen 18
4.0.0	Versuchsteil 20
4.1.0	Untersuchungen zum Stoffwech- sel von C-14 Indomethacinserin an der isoliert perfundierten Rattenleber 20
4.1.1	Versuchsanordnung 20
4.1.2	Operationsverlauf 22
4.1.3	Vorversuche zur Perfusion und Extraktion 24
4.1.4	Perfusionsablauf und Aufarbei- tung des Mediums 25
4.1.5	In vivo-Pharmakokinetik von C-14 Indomethacinserin an der Ratte 28
4.16	Bestimmung der Gesamtradio- aktivität und deren Vertei- lungsmuster im Plasma und in den Fäces der Ratte 29
4.17	Metabolitengewinnung zur spek- trometrischen Identifizierung aus Rattenurin 29
5.0.0	Ergebnisse 31
5.1.0	Pharmakokinetik von C-14 Indo- methacinserin an der isoliert perfundierten Rattenleber 31
5.1.1	Untersuchungen zur Funktion der isoliert perfundierten Leber ohne Indomethacinserin 31

5.1.2	Untersuchung an der isoliert perfundierten Leber mit Indomethacinserin	33
5.1.3	Metabolisierung von C-14 Indomethacinserin durch die isoliert perfundierte Rattenleber	35
5.2.0	in vivo-Pharmakokinetik von C-14 Indomethacinserin bei der Ratte	40
5.2.1	Gesamt-C-14-Aktivität in Urin und Fäces der Ratte nach oraler Applikation von C-14-markiertem Indomethacinserin	40
5.2.2	Metabolitenverteilungsmuster im Rattenurin nach oraler Applikation von C-14 Indomethacinserin	43
5.3.0	Konstitutionsaufklärung	45
6.0.0	Diskussion	52
7.0.0	Zusammenfassung	66
8.0.0	Literatur	67

Testsubstanzen

1 - (p-chlorbenzoyl) - 5 - methoxy-2-methyl-indol-3-acetyl-serin

Indomethacinserin (IS) (1)

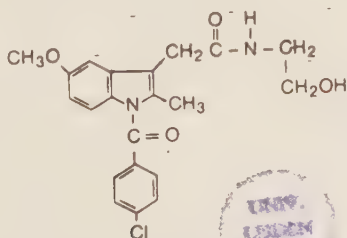


Indomethacin Serin
IS

1 - (p-chlorbenzoyl) - N - (2-hydroxy-aethyl)-5-methoxy-2-methyl-indol-3-acetamid

Decarboxylindomethacinserin (DCIS) (2)

2. Decarboxylindomethacinserin

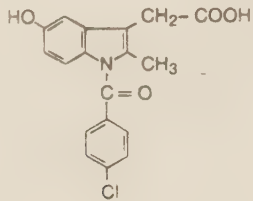


DCIS

1 - (p-chlorbenzoyl) - 5 - hydroxy-2-methyl-indol-3-essigsäure

O - Demethylindomethacin (DMI) (3)

3. O-Demethylindomethacin

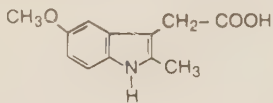


DMI

Methoxy-2-methyl-indol-3-essigsäure

Debenzoylindomethacin (DBI) (4)

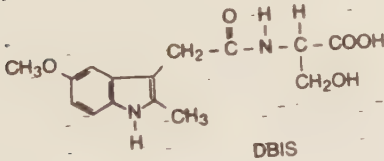
4. Debenzoylindomethacin



DBI

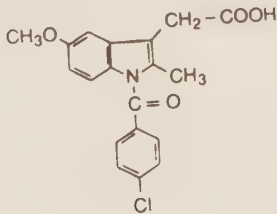
Methoxy-2-methyl-indol-3-acetyl-serin

Debenzoylindomethacinserin (DBIS) (5)



- 1 - (p-chlorbenzoyl) - 5 - methoxy-2-methyl-indol-3-
essigsäure

Indomethacin (I) (6)



x Positionierung des C-14

1.0.0 EINLEITUNG

Es gibt bis heute keine kausale Therapie der chronisch rheumatischen Erkrankung. Alle zur Zeit verwendeten Pharmaka, insbesondere die nicht-steroidalen Entzündungshemmer wie zum Beispiel Aspirin, Phenylbutazon, Indomethacin, dienen der symptomatischen Behandlung und müssen als Langzeittherapeutika eingesetzt werden.

Leider haben die erwähnten Medikamente unerwünschte Nebenwirkungen wie Urticaria, Schwindel, Kopfschmerzen, Pancytopenien und gastro-intestinale Störungen bis hin zu peptischen Ulcera, wobei die Ulcerogenität bei weitem das Hauptproblem darstellt, und die akute gastro-intestinale Blutung unter Antirheumatica als Notfall in der Klinik nicht selten ist.

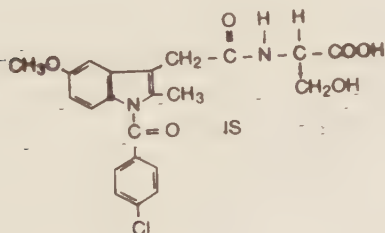
Solange die Ursachen der rheumatischen Erkrankungen nicht geklärt sind und somit eine kausale Therapie nicht möglich ist, besteht weiterhin die Notwendigkeit, für die symptomatische Behandlung neue, wirksame Substanzen zu entwickeln.

Auf der Suche nach einem gut wirksamen, im Vergleich zu den bisher klinisch verwendeten nicht-steroidalen Entzündungshemmern aber weniger ulcerogenen Pharmaca wurden in den Forschungslaboratorien der Fa.Schering AG eine Reihe von Aminosäurederivaten des Indomethacin (I) synthetisiert. Im orientierenden Versuch an der Ratte zeigte sich, daß einige dieser Verbindungen im Vergleich zu Indomethacin (I) bei guter entzündungshemmender Wirkung weniger ulcerogen waren. Für weiterführenden Experimente wurde der Wirkstoff Indomethacin-Serin (IS)

ausgewählt.

Die chemische Bezeichnung ist

1-(p-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indol-3-acetyl-serin.



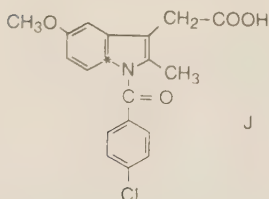
Indomethacin-Serin (IS).

Erste grundlegende Informationen über die Metabolisierung von Indomethacin-Serin (IS) bei der Ratte zu erarbeiten, war Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Bereits in einem sehr frühen Stadium der Bearbeitung der Stoffklasse der Aminosäurederivate des Indomethacin(I) stellte sich die Frage, ob Indomethacinserin (IS) per se als Entzündungshemmer zu betrachten sei oder aber im Organismus metabolisch zunächst in Indomethacin (I) umgewandelt werden müßte, um entzündungshemmend zu wirken, das heißt, ob Indomethacinserin (IS) im Sinne eines pro-drug zu betrachten sei. Da es das Ziel war, einen nicht steroidalen Entzündungshemmer zu finden, der gegenüber Indomethacin (I) deutliche Vorteile besonders im Hinblick auf geringere Nebenwirkungen haben sollte, gewann die Frage, ob Indomethacinserin (IS) per se wirkt oder als pro-drug zu betrachten ist, einen hohen Stellenwert, in dem Sinne, daß festgelegt wurde, daß die Bearbeitung des Indomethacinserin (IS)-Projektes zu beenden sei,

falls Indomethacinserin (IS) ein pro-drug wäre. Denn in diesem Falle hätte man hinsichtlich klinischer Wirkungen und Nebenwirkungen mit dem vom Indomethacin bekannten Spektrum rechnen müssen.

Es war daher die wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit, durch Untersuchungen zum Metabolismus von Indomethacinserin an der Ratte, Hinweise zu bekommen, ob die an der Ratte festgestellte entzündungshemmende Wirkung über Indomethacinserin (IS) per se oder aber über das möglicherweise als Metabolit anfallende Indomethacin (I) erklärt werden konnte.

Die Synthese von Indomethacin (I), chemische Bezeichnung 1-(p-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indol-3-essigsäure,



Indomethacin (I)

wurde von SHEN et al. (1) zuerst 1963 beschrieben. Indomethacin (I) besitzt die charakteristischen Eigenschaften eines nicht-steroidalen Entzündungshemmers: diese umfassen eine entzündungshemmende, eine antipyretische und eine analgetische Wirkungskomponente sowie einen hemmenden Effekt auf die Thrombocytenaggregation. Die für diesen Wirkungsmechanismus zur Zeit wohl überzeugendste Erklärung ist die Hemmung der Prostaglandin-Synthetase durch nicht-steroidale Entzündungshemmer (17, 18,

19, 20, 21). Über Resorption, Verteilungsmuster und Abbau von Indomethacin (I) bei der Ratte liegen ausführliche Untersuchungen vor (3, 4, 5, 6). Indomethacin (I) wird nach oraler Applikation von der Ratte zu 93% absorbiert (4, 6). Ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Resorbierbarkeit der Wirksubstanz besteht darin, nach intravenöser Injektion und oraler Gabe der Substanz, die mit Urin und Fäces eliminierten Radioaktivitätsmengen beider Applikationsformen zu vergleichen.

Die Resultate an der Ratte für orale und intravenöse Applikation von C-14 markiertem Indomethacin (I) zeigen, daß die nach beiden Applikationsformen im Urin gemessenen Radioaktivitätsmengen praktisch gleich groß sind, was als Beleg für die quantitative Absorption oraler Dosen angesehen werden kann.

Beim Menschen wird Indomethacin (I) nach oraler Gabe zu 90% absorbiert (10, 11).

Indomethacin (I) wird bei der Ratte durch das mikrosomale System der Leber durch O-Demethylierung und durch eine extramikrosomale Debenzoylierung zu den biologisch inaktiven Metaboliten abgebaut (4, 6, 12). Die Metabolite werden zu etwa gleichen Teilen mit Urin und Fäces ausgeschieden.

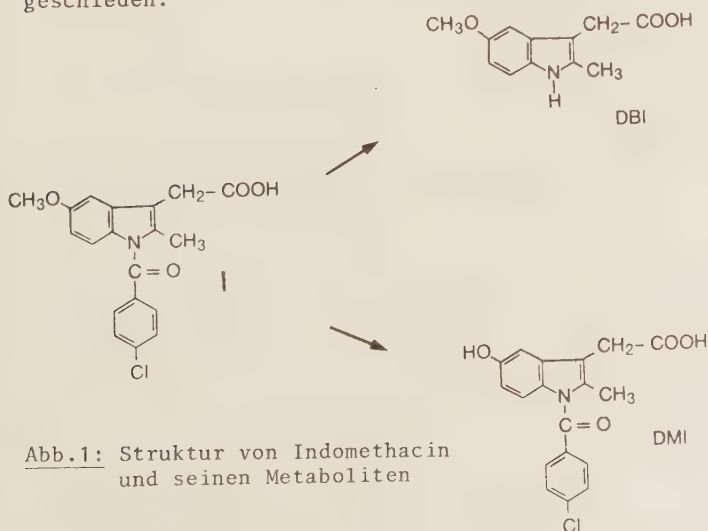
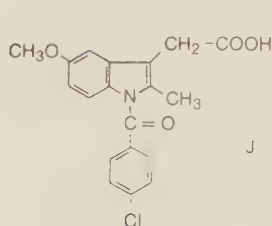
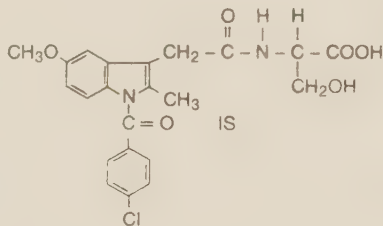


Abb.1: Struktur von Indomethacin und seinen Metaboliten

Ein Vergleich der chemischen Struktur von Indomethacin (I) und Indomethacinserin (IS) zeigt, daß der Verdacht nicht ausschließbar ist, daß Indomethacinserin im Organismus in Indomethacin überführt wird.



Indomethacin I



Indomethacinserin IS

Indomethacin (I) und Indomethacinserin (IS) unterscheiden sich durch verschiedene Substituenten am Indolkern. Im Indomethacin ist es die Essigsäure in 3-Stellung. Im Indomethacinserin ist die Essigsäure unter Wasserabspaltung über den Aminostickstoff mit der Aminosäure Serin verbunden.

Bei der Metabolisierung des Indomethacinserin im Organismus sind folgende Abbauege denkbar:

1. Konjugatbildung.
2. Decarboxylierung zu Decarboxylindomethacinserin.
3. Abspaltung des Serinteils zu Indomethacin (möglicherweise durch Carboxypeptidasen).
4. O-Demethylierung zu Demethylindomethacinserin.
5. N-Debenzoylierung zu Debenzoylindomethacinserin.

In Kenntnis des Indomethacinstoffwechsels und unter Berücksichtigung von üblichen, oben erwähnten Metabolisierungsreaktionen, wurden zunächst hypothetisch mögliche Metabolite des Indomethacinserins formuliert und in folgendem Schema dargestellt:

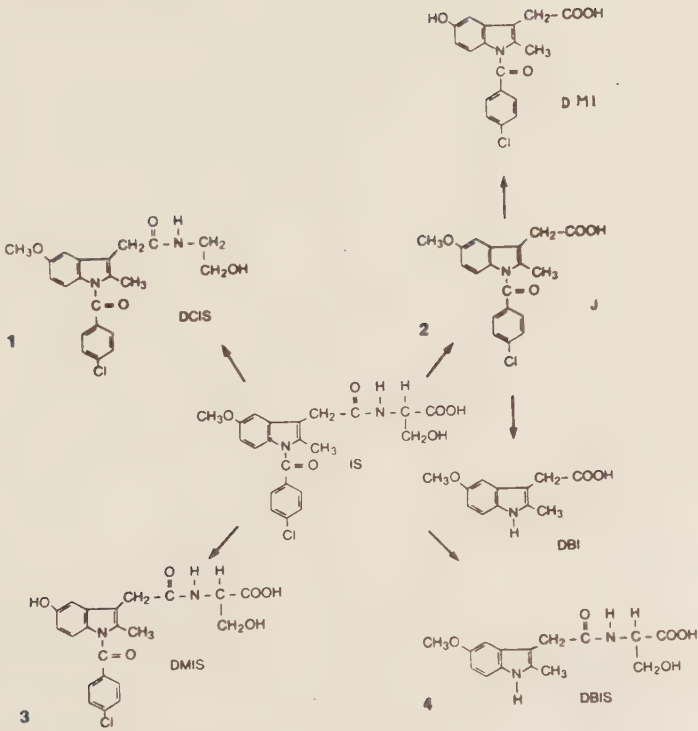


Abb.2: Hypothetische Metaboliten des Indomethacinserin.

Um zu verhindern, daß im Rahmen der Stoffwechseluntersuchungen an der Ratte aufwendige Analysenmethoden erstellt werden mußten, wurde Indomethacinserin mit C-14 markiert⁺⁾ . Die C-14 Markierung im Indolkern wurde so gewählt, daß die hypothetischen Metaboliten des Indomethacinserin analytisch erfaßt werden konnten.

Es wurde vorstehend bereits erwähnt, daß Indomethacinserin nur dann weiter entwickelt werden sollte, wenn in den vorliegenden Stoffwechseluntersuchungen wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß Indomethacinserin per se wirkt. Für diesen Fall sollten die geplanten Untersuchungen zum Stoffwechsel etwas in der Fragestellung ausgeweitet werden, um bereits an dieser Stelle erste Informationen zur Resorption, Verteilung und Ausscheidung des Indomethacinserin bei der Ratte zu erhalten. Zur Beantwortung der in dieser Arbeit gestellten Fragen, sollten drei Wege beschritten werden:

1. Es sollte zunächst ein Überblick über den Abbauweg des Indomethacinserin an der isoliert perfundierten Rattenleber gegeben werden, da die hierbei erhaltenen Ergebnisse besser als die an isolierten Zellbestandteilen, Homogenaten oder Leberschnitten darstellbaren eine Aussage über in vivo Verhältnisse zulassen. Darüber hinaus ist es einfacher, die zur Aufarbeitung, Extraktion und Trennung notwendigen Methoden zunächst in einem Medium zu entwickeln, das nicht wie zum Beispiel Urin und Fäces die verschiedensten organischen Verunreinigungen aufweist.

⁺⁾ Ich danke Herrn Dr.R.E.SCHULZE, Departement Isotopenchemie der Fa.Schering AG, für die C-14 Markierung des Indomethacinserin.

Durch Vorversuche wurde der pH-Bereich ermittelt, in dem Indomethacinserin und seine möglichen Metaboliten unverändert aus dem Perfusionsmedium extrahiert werden konnten. In einer weiteren Versuchsreihe wurden organische Lösungsmittel unter dem Gesichtspunkt einer möglichst hohen Ausbeute getestet. Zur Kontrolle der Stabilität der Verbindungen während des Extraktionsvorganges wurde jeweils eine dünnschichtchromatographische Untersuchung angeschlossen.

Mit den an der isoliert- perfundierten Rattenleber erhaltenen Erfahrungen sollte dann der Stoffwechsel von C-14 Indomethacinserin in vivo nach oraler Applikation an der Ratte untersucht werden, wobei der Schwerpunkt der Untersuchung auf den Urin beschränkt sein sollte.

Im Falle der erfolgreichen Charakterisierung der Metaboliten des Indomethacinserin an der isoliert-perfundierten Rattenleber und im Urin der Ratte sollte in einer weiteren Untersuchungsreihe versucht werden, die zunächst nur chromatographisch charakterisierten radioaktiven Verbindungen durch Verabreichung großer Mengen nicht markierten Indomethacin an der Ratte in präparativem Maßstabe aus dem Urin der Ratte darzustellen.

mit dem aus Rattenurin im präparativen Maßstab isolierten Verbindungen sollte eine Identifikation durch physikalische Methoden versucht werden.

2.0.0 REACENZIIEN UND GERATE

2.1.0 Reagenzien

Serum Albumin vom Rind, reinst, Behringwerke Marburg
Calciumlactat (L_+) p.a., Serva, Heidelberg
 α d-Glukose reinst, Serva, Heidelberg
Indomethacin p.a., E.Merck, Darmstadt

Alle hier nicht speziell genannten Reagenzien und Lösungsmittel hatten p.a.Qualität und wurden von E.Merck, Darmstadt, bezogen.

GOT- und GPT-Bestimmung mit den Biochemica Tests, Boehringer, Mannheim.

Glukosebestimmung nach der GOD-Methode, Boehringer, Mannheim.

Krebs-Henseleit Puffer zur Leberperfusion in folgender Zusammensetzung:

NaCl	0.188	MOL/l
KCl	0.0047	MOL/l
$CaCl_2$	0.0013	MOL/l
$MgSO_4$	0.0012	MOL/l
$KHSO_4$	0.0012	MOL/l
$NaHCO_3$	0.0250	MOL/l

Endkonzentration der im Krebs-Henseleit Puffer gelösten Zusatzsubstanzen:

Substanz	Operations- medium mMOL/l	Vorperfusions- medium mMOL/l	Perfusions- medium mMOL/l
Calciumlactat	0.879	0.893	0.893
Na-Pyruvat	0.225	0.239	0.293
α -d-Glukose	5.506	11.012	11.012
Heparin	2.5 mg/100 ml		

2.1.1 Geräte

Photometer "Eppendorf" Netheler und Hinz GmbH,
Hamburg

Dünnschicht Scanner Lb 27 21, Fa.Berthold

Liquid Scintillation Spectrometer Tri-Carb, Serie 3.000

Packard Instrument Company, Ill. U.S.A.

3.0.0 METHODIK

3.1.1 Herstellung des Fließmittelsystems für die Dünnschichtchromatographie (DC)

1.000 ml Toluol und 1.000 ml Eisessig werden gemischt und auf +15°C abgekühlt. Diese Mischung wird im Scheidetrichter mit 140 ml Aqua dest. versetzt und einmal kräftig geschüttelt.

Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Unterphase verworfen. Die stabile Toluol/Eisessig/Wasser-Oberphase wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt und in aliquoten Teilen zur Chromatographie benutzt.

3.12 Chromatographische Substanzauftrennung

Zur dünnsschichtchromatographischen Trennung wurden Kieselgel Fertigplatten 60 F 254 benutzt. Die Schichtdicke betrug 0,25 mm, die Plattengröße 20 x 20 cm.

3.13 Biochemische Bestimmungen

Die K^+ Konzentration der Perfusionsproben wurde flammenphotometrisch im Autoanalyser der Fa.Technicon bestimmt. Zur Glukosebestimmung wurden die Proben mit Uranylacetat enteweißt und zentrifugiert. Die Glukosebestimmung erfolgte aus dem eiweißfreien Überstand mit Hilfe eines Farbtestes der Fa.Boehringer, Mannheim, nach der GOD-Methode.

Lactat, Pyruvat, GPT und GOT wurden mit den Biochemica Tests der Fa.Boehringer, Mannheim, bestimmt.

3.14 Radioaktivitätsmessung

3.141 Vom Perfusionsmedium (Gesamtvolumen 200 ml) wurden jeweils 2 x 0,5 ml in 10 ml Insta Gel zur Messung im Liquid Scintillation Spectrometer Tri-Carb gegeben.

Die C-14 Messung erfolgte zu den Zeiten 0 (Vor-perfusion) und 40, 60, 90 und 120 Minuten.

Die Aktivität des Restperfusates jeder Perfusion wurde in je 2 x 0,5 ml in je 10 ml Insta Gel gemessen.

3.142 Von der isoliert gesammelten Gallenflüssigkeit von etwa 0,5 ml Gesamtmenge pro Perfusion wurden je 2 x 0,1 ml in je 10 ml Insta Gel der Messung eingesetzt.

3.143 In dem nach 6 - 12 - 24 - 48 Stunden erhaltenen Sammelurin von jeweils etwa 7 ml wurde von 2 x 0,02 ml in je 10 ml Insta Gel die C-14-Aktivität gemessen.

3.144 Die Bestimmung der C-14-Aktivität in den Essig-esterextrakten erfolgte nach entsprechender Konzentrierung der Extrakte in jeweils 2 x 0,01 ml Essigester in je 10 ml Insta Gel.

3.145 Die Bestimmung der C-14-Aktivität in den wäßrigen Phasen erfolgte aus jeweils 2 x 0,02 ml in je 10 ml Insta Gel.

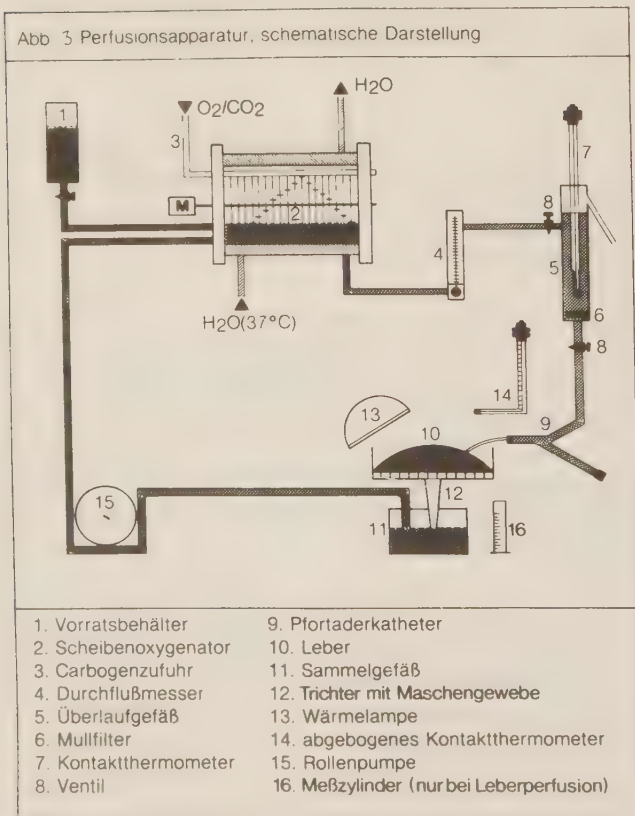
3.146 Zur Bestimmung der C-14-Aktivität auf den Dünnschichtplatten nach Chromatographie wurde das Kieselgel senkrecht zur Laufrichtung in 0,5 cm breiten Streifen abgeschabt und in je 10 ml Insta Gel zur C-14-Messung gebracht.

4.0.0 VERSUCHSTEIL

4.1.0 Untersuchungen zum Stoffwechsel von C-14 Indomethacin in der isoliert perfundierten Rattenleber

4.1.1 Versuchsanordnung

Die Perfusion der isolierten Rattenleber wurde in einer bei der Fa. Schering AG entwickelten Apparatur durchgeführt. Die apparative Anordnung ist in Abb.3 schematisch dargestellt.



Die Perfusionsapparatur befindet sich in einem allseits geschlossenen Kasten mit Plexiglastüren. Um anfallende Arbeiten während der Perfusion, zum Beispiel Probeentnahmen, durchführen zu können, sind in die Türen mehrere verschließbare Öffnungen eingebaut.

Das Perfusionsmedium gelangt vom Vorratsbehälter (1) in einen Scheibenoxxygenator (2), der mit Hilfe des Durchflußthermostaten das Medium konstant auf 37°C temperiert. Das durch die rotierenden Scheiben bewegte Medium wird kontinuierlich mit einem Gemisch (3) auf 95 %O₂ und 5 %CO₂ begast. Das Medium gelangt aus dem Scheibenoxxygenator durch einen Durchflußmesser (4), aus dem das Volumen in ml/Std. ablesbar ist, in das Überlaufgefäß (5) und weiter durch einen Mullfilter (6) und über ein Ventil (8) in den Pfortaderkatheter (9). Der Flüssigkeitsspiegel im Überlaufgefäß (5) wird so eingestellt, daß er sich ca. 20 cm über dem Leberniveau befindet. Damit wird der notwendige hydrostatische Druck zur Erzielung der notwendigen Durchflußgeschwindigkeit erreicht. Durch das in das Überlaufgefäß reichende Kontaktthermometer (7) wird die Temperatur des Mediums kurz vor Eintritt in die Leber überwacht. Nach dem Durchströmen der Leber (10) tropft das Perfusionsmedium in ein Sammelgefäß (11). Die Gallenflüssigkeit wird in einem Meßzylinder (12) aufgefangen. Die Temperatur über der Leber (20) wird mit Hilfe einer Wärmelampe (13) und einem abgebogenen Kontaktthermometer (14) auf 37°C gehalten. Während der Perfusion wird mit Hilfe einer Rollpumpe (15) das Medium in den Oxxygenator (2) zurückgepumpt (Recycling).

4.12 Operationsverlauf

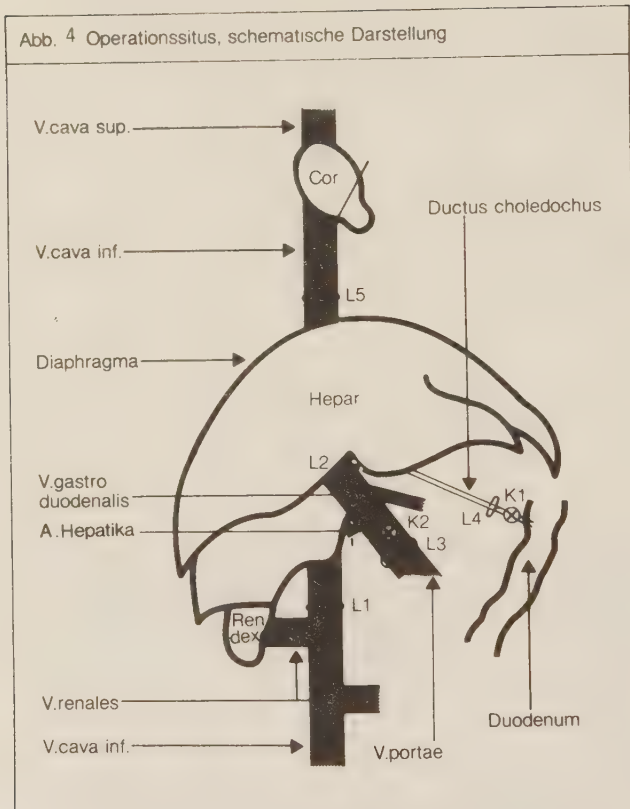


Abb.4: Operationssitus, schematische Darstellung

Die zur Präparation der Leber erforderlichen Einzelschritte sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Nach Incision des Ductus choledochus unterhalb seiner Einmündung in das Duodenum wurde eine Gallenfistel (K_1/L_4) angelegt, um so während der Perfusion den Gallenabfluß quantitativ bestimmen zu können. Durch Anheben der oberen Pfortaderligatur (L_2) wurde der Blutfluß zur Leber gestaut. Zur gleichen Zeit wurde die untere Pfortaderligatur (L_3) geschlossen. In die so gestaute Vena portae wurde über eine kleine Incision der Katheter (K_2) eingeführt, über den die Leber während der Operation mit dem Medium perfundiert wird.

Der Katheter (K_2) wurde bis zum Leberhilus vorgeschoben und mit der oberen Ligatur (L_2) fixiert.

Mit wenigen Schnitten wurde der Thorax dann geöffnet, wobei darauf zu achten war, daß die unteren Rippenbögen mit dem unverletzten Zwerchfell stehen blieben. Die Herzspitze wurde abgeschnitten und ein Katheter durch den rechten Vorhof in die Vena cava inferior eingeführt und eingebunden (L_5). So konnte das die Leber durchströmende Operationsmedium frei ablaufen. Zuletzt wurde nur noch die offene erste Ligatur (L_1) geschlossen, um einen möglichen Rückfluß zu verhindern. Die Operationszeit durfte maximal fünf Minuten betragen. Nach Unterbrechung des natürlichen Kreislaufes bei der Umschaltung von Blutkreislauf auf Perfusionsmedium durften nicht mehr als sechs Sekunden vergehen.

Die an das Perfusionssystem angeschlossene Leber wurde ex situ präpariert und in einem Glastrichter von 5 cm Durchmesser auf einem Kunststoffsieb so gelagert, daß das Perfusionsmedium ungehindert in das Sammelgefäß (11) abfließen konnte. Nach Operationsschluß und Beginn der Perfusion wurde die Leber zunächst über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Perfusionsmedium durchspült, wobei eine Durchströmungsgeschwindigkeit von 40 ml/Min. eingestellt wurde. Dies diente der Erholung des Lebergewebes.

Zur Kontrolle des physiologischen Zustandes der Leber wurden im Perfusionsmedium mehrmals K^+ , Lactat, Pyruvat, Glukose, GOT und GPT bestimmt.

4.13 Vorversuche zur Perfusion und Extraktion

Zur Einarbeitung in die Methode der Leberperfusion wurden mehrere "Leerperfusionen", das heißt ohne Zusatz von Indomethacinserin, durchgeführt.

Es ist bekannt (3), daß die Stabilität von Indomethacin und seinen Metaboliten in gelöstem Zustand pH-abhängig ist und es war anzunehmen, daß dies ebenso für Indomethacinserin gelten müßte.

Es wurden daher mehrere "Perfusionen" ohne Leberdurchfluß durchgeführt, bei denen dem Perfusionsmedium jeweils bestimmte Mengen von Indomethacinserin und seinen synthetisierten Metaboliten zugesetzt worden war. Die Aufarbeitung erfolgte bei verschiedenen pH-Werten, um den pH-Wert zu ermitteln, bei dem Indomethacinserin und die Metaboliten unverändert und in maximaler Ausbeute zurückgewonnen werden konnten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Lösungsmittel getestet, die aufgrund ihrer Polarität zu den zu extrahierenden, im Perfusionsmedium gelösten Substanzen ausgewählt worden waren und die eine ausreichende Rückgewinnung von Indomethacinserin und Metaboliten ermöglichten. Zur Kontrolle der Stabilität wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet.

4.14 Perfusionsablauf und Aufarbeitung des Mediums

Eingesetzt wurden vier weibliche Wistarratten von je 200 - 220 g Körpergewicht, denen zwölf Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde, die aber Wasser ad libidum erhielten.

Die Leber wurde - wie unter 4.12 beschrieben- zur Perfusion vorbereitet. Zur Erreichung eines steady state wurde das Organ 30 Minuten mit 200 ml Vorperfusionsmedium bei 37°C unter Kontrolle von Kalium, Natrium, Glukose, Lactat, Pyruvat, GOT und GPT bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml/Min. durchströmt. Danach erfolgte die Zugabe von C-14 Indomethacinserin, das in je 2 ml 0.001 NNaOH gelöst war.

- | | |
|------------|---|
| 1.Versuch: | 0.005 μ CI = 0.28 mg gelöst in 2 ml 0.001 NaOH |
| 2.Versuch: | 0.045 μ CI = 2.46 mg gelöst in 2 ml 0.001 NaOH |
| 3.Versuch: | 0.020 μ CI = 1.00 mg gelöst in 2 ml 0.001 NaOH |
| 4.Versuch: | 0.018 μ CI = 1.00 mg gelöst in 2 ml 0.001 NaOH. |

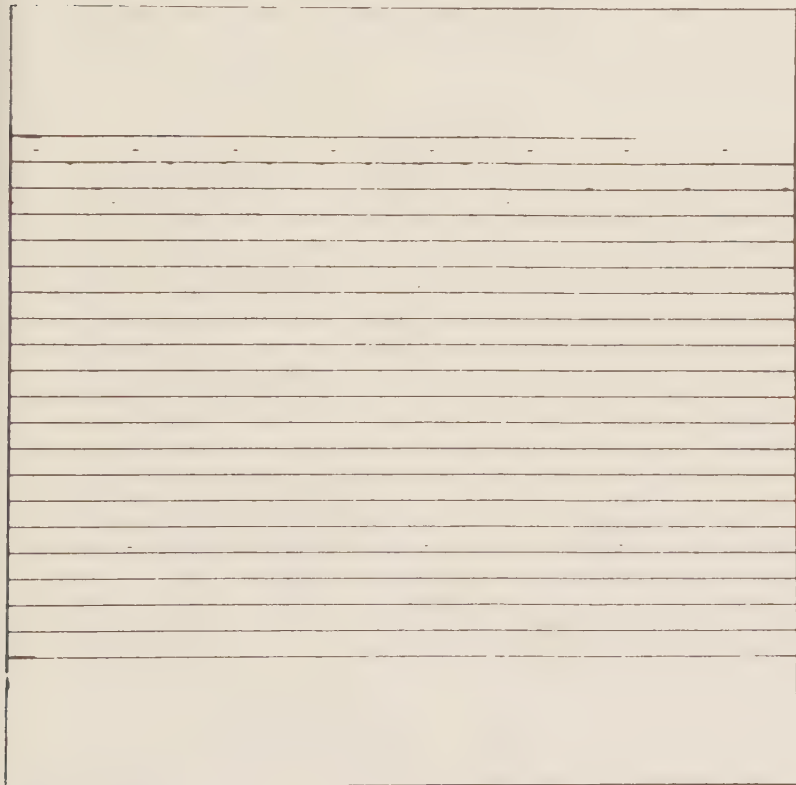
Jeweils 10 - 20 - 60 und 90 Minuten nach Substanzzugabe wurde im Auffanggefäß hinter der Leber 25 ml Perfusat entnommen. Davon dienten 5 ml zur Durchführung der biochemischen Messungen und 2 x 9,0 ml zur Bestimmung des Indomethacinserin und seiner möglichen Metaboliten. Zu 9 ml Perfusat wurde 1 ml 1 N HCL gegeben und damit der pH-Wert auf 4.0 eingestellt, ein Wert, der sich in Vorversuchen als günstig erwiesen hatte hinsichtlich Stabilität und Ausbeute der zu isolierenden Substanzen.

Nun wurde zweimal mit je 25 ml Essigester vorsichtig (Emulsionsbildung) von Hand unter Schütteln extrahiert, die vereinigten organischen Oberphasen am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur im Wasserstrahlvakuum vorsichtig zur Trockene eingengt und der Rückstand mit wenigen Millilitern Essigester in ein graduiertes 10 ml Spitzglas über-

führt. Im N_2 -Strom bei Raumtemperatur wurde erneut zur Trockene eingengt, der Rückstand in 0.05 ml Methanol gelöst. 10 μ l der methanolischen Lösung wurden auf eine DC-Platte parallel mit 20 μ l einer methanolischen Standardlösung (0.05 molar) von Indomethacinserin, Decarboxylindomethacinserin, Demethylindomethacinserin, Debenzoylindomethacin, Debenzoylindomethacinserin, und Indomethacin mittels einer Hamiltonspritze aufgetragen und bis zu einer Laufhöhe von 10 cm aufsteigend chromatographiert. Die Platte wurde anschließend 15 Minuten bei 35°C im Trockenschrank getrocknet. Zur Ermittlung der Rf-Werte der Standardsubstanzen wurden die Platten unter UV-Licht (259 nm) betrachtet und die nun sichtbaren Substanzflecken umrandet. Die radioaktiven Verbindungen (Indomethacinserin und seine Metabolite) wurden am Scanner lokalisiert. Die entsprechenden ebenfalls umrandeten radioaktiven Substanzflecken wurden mit einer Rasierklinge abgeschabt, mit den entsprechenden Testsubstanzen vermischt und erneut aufsteigend chromatographiert, um einen ersten Anhalt für das chromatographische Verhalten zu gewinnen.

Die quantitative Verteilung der radioaktiven Verbindungen wurde auf folgende Weise ermittelt: 20 μ l des in 0.05 ml Methanol gelösten Extraktes des Perfusionsmediums wurden mit einer Hamiltonspritze strichförmig horizontal in einer Länge von 6 cm aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. Nach Trocknung der Platte wurde der Zwischenraum von 10 cm zwischen Start- und Frontlinie im Abstand von je 0.5 cm mit horizontalen Markierungslinien unterteilt. Die so abgeteilten 20 Felder wurden mit einer Rasierklinge sorgfältig abgeschabt. Das so abgeschabte Kieselgel wurde in je 10 ml Insta Gel gegeben und die C-14-Aktivität jeder Probe gemessen.

Die Gesamtradioaktivität der 20 Proben wurde 100% gesetzt und die Radioaktivität der einzelnen Streifen als Prozent der Gesamtaktivität ausgedrückt.



15cm

Abb.5: Aufteilung einer DC-Platte in 20 Felder zur quantitativen Bestimmung der radioaktiven Verbindungen (Indomethacinserin und seine Metabolite).

4.15 In vivo-Pharmakokinetik von C-14 Indomethacinserin an der Ratte

Vier männliche Wistarratten mit einem Körpergewicht von 220 bis 240 g, die Futter und Wasser ad libidum bekamen und in Stoffwechselkäfigen, die eine getrennte Sammlung von Fäces und Urin erlaubten, gehalten wurden, erhielten per os je 1.1 mg C-14 Indomethacinserin entsprechend 0.02 μ Ci, gelöst in 0.2 ml Aqua dest.

Die Identität und Reinheit der radioaktiven Substanz wurde jeweils vor Versuchsbeginn chromatographisch geprüft. Über 6, 12, 24 Stunden und bei einem Tier zusätzlich über 32 Stunden wurden die Urinproben gesammelt und in einem aliquoten Teil die Gesamtradioaktivität gemessen. Die Urinsammelgefäße wurden zur Unterdrückung des Bakterienwachstums mit 0.1 ml Toluol versetzt, zusätzlich wurde NH_4Cl in die Sammelgefäße gegeben, um so den pH-Wert bei 6 - 6.5 zu halten. In diesem pH-Bereich hatten sich die zur Verfügung stehenden Metaboliten des Indomethacinserin als stabil erwiesen. In Vorversuchen war eine Methode entwickelt worden, die es erlaubt, aus wäßrigen Medien Indomethacinserin und seine möglichen Metaboliten zu extrahieren. Bei der Extraktion mit Essigester bleiben die glucoronisierten Metaboliten in der wäßrigen Phase zurück.

Je 10 ml Rattenurin wurden mit 1 N HCL auf pH 4.0 eingestellt und dreimal mit je 30 ml Essigester von Hand im Scheidetrichter extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum bei Zimmertemperatur auf 5 ml eingengt und durch Filtration über einer mit Aktivkohle gefüllten Glassäule von 2 cm Durchmesser und 10 cm Länge vorgereinigt. Das Essigestereluat wurde nun im Spitzglas im N_2 -Strom zur Trockene eingengt und in 0.05 ml Methanol gelöst: 10 μ l wurden

auf eine DC Platte zusammen mit 20 µl Standard aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. Die chromatographische Charakterisierung und quantitative Bestimmung der radioaktiven Verbindungen erfolgten wie unter 4.14 beschrieben.

4.16 Bestimmung der Gesamtradioaktivität und deren Verteilungsmuster im Plasma und in den Fäces der Ratte

Bei zwei der vier Versuchstiere wurden nach 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden je 0.3 ml Blut mit einer geschärften Pipette aus dem Sinus orbitalis entnommen. Das abzentrifugierte Plasma wurde - wie oben beschrieben - extrahiert und der Extrakt dünnschichtchromatographisch getrennt.

Bei zwei der vier Ratten wurden über 24 Stunden im Stoffwechselkäfig die Fäces gesammelt, in 10 ml Wasser aufgeschwemmt und in einem aliquoten Teil der Suspension die Gesamtradioaktivität gemessen. Darauf wurde die Suspension extrahiert und der Extrakt chromatographiert.

4.17 Metabolitengewinnung zur spektrometrischen Identifizierung aus Rattenurin

Männliche Ratten von 220- 240 g Körpergewicht erhielten Futter und Wasser ad libidum. Sie bekamen am ersten und zweiten Versuchstag per os je 10 mg/kg Körpergewicht Indomethacinserin (IS). Die Substanz war in 0.01 NaOH gelöst und mit KH-Puffer auf pH 7.4 eingestellt worden. Das Applikationsvolumen war 0.2 ml. In Stoffwechselkäfigen wurden die Tiere über drei Tage gehalten.

Die Urinsammelperioden betrugen über Tag sechs Stunden, während der Nacht zehn Stunden. Jeweils 50 ml Sammelurin wurden nach der vorstehend beschriebenen Methode extrahiert und gereinigt. Je 50 µl des in Methanol gelösten Rückstandes wurden strichförmig auf DC-Platten aufgetragen und wie beschrieben aufsteigend chromatographiert. Die streifenförmige Bande wurde mit einer Rasierklinge abgeschabt. Die sich entsprechenden Streifen der einzelnen Platten wurden vereinigt und das Kieselgel mehrfach mit Methanol extrahiert. Das Methanol wurde im Vakuum eingeeengt. Zur Reinigung der Extrakte wurde nach der ersten chromatographischen Auftrennung noch insgesamt dreimal rechromatographiert.

Die auf diese Weise gereinigten Verbindungen wurden in je 0.2 ml Essigester-Äther (1.5: 0.5 V/V) zweimal umkristallisiert, getrocknet und zur spektrophotometrischen Untersuchung gegeben.

Zur Substanzgewinnung für diese Identifizierung der durch Chromatographie wahrscheinlich gemachten Metaboliten wurden nach der vorstehend beschriebenen Methode 2.5 l Rat-tenurin in ungefähr 50 einzelnen Ansätzen aufgearbeitet.

5.0.0 ERGEBNISSE

5.1.0 Pharmakokinetik von C-14 Indomethacinserin an der isoliert perfundierten Rattenleber

5.1.1 Untersuchungen zur Funktion der isoliert perfundierten Leber ohne Indomethacinserin-----

Die Möglichkeit, Stoffwechseluntersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber durchzuführen, wurde von mehreren Arbeitsgruppen (13, 14, 15, 16) nachgewiesen.

Für den Funktionszustand der Leber dienten - wie oben erwähnt - folgende biochemische Parameter:

Glucose

Lactat L/P-Quotient

Pyruvat

GOT, GPT

K⁺.

Zur Überprüfung des eigenen Modells wurden einige Versuche zur Funktion der perfundierten Leber ohne Indomethacinserin (IS) durchgeführt. Es wurden bewußt im Ausgangsmedium verschiedene Lactat- und Pyruvatkonzentrationen eingesetzt, um die Fähigkeit der perfundierten Leber zu prüfen, einem dem physiologischen Redoxzustand entsprechenden L/P-Quotienten von 10 - 20 im Medium aufrecht zu erhalten. Denn nach den Untersuchungen von SCHIMASSEK (13, 14), STAIB (15) und FRIMMER (16) beträgt der Lactat/Pyruvat-Quotient in der Leber in vivo etwa 10 und stellt sich im Perfusionsmedium der isoliert perfundierten Rattenleber ebenfalls auf etwa 10 ein. Da der L/P-Quotient eine empfindliche Meßgröße für das Redox-System der Leber darstellt, zeigen Quotienten über 20 einen erhöhten Hydrierungsgrad und damit eine unphysiologische Abweichung an.

Versuch 1

		Glucose mg% $\mu\text{Mol/l}$	Lactat $\mu\text{Mol/l}$	Pyruvat $\mu\text{Mol/l}$	L/P Quotient	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K ⁺ μVA
AM		132 7330	5375	530	10	1.8	0.9	5.4
1.	AB	153 8500	2845	375	8	1.8	1.3	5.5
2.	"	156 8660	2340	401	6	2.2	1.3	5.7
3.	"	160 8900	1925	423	5	2.5	1.7	6.2
4.	"	161 8940	1825	466	4	2.7	2.2	6.4
5.	"	163 9060	1685	427	4	3.5	2.7	6.5
6.	"	161 8950	1635	339	5	8.6	2.9	6.4
7.	"	159 8840	2085	295	7	11.2	3.1	6.2
8.	"	159 8840	2115	253	8	13.1	4.2	6.5
9.	"	156 8660	2000	213	9	15.6	4.6	6.9

Versuch 2

		Glucose mg% $\mu\text{Mol/l}$	Lactat $\mu\text{Mol/l}$	Pyruvat $\mu\text{Mol/l}$	L/P Quotient	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K ⁺ μVA
		Hauptperf.						
AM		233 12960	1638	154	10	2.2	1.8	4.9
1.	AB	225 12500	1870	171	11	3.8	2.2	5.5
2.	"	215 11940	2260	211	11	5.6	2.2	5.3
3.	"	204 11330	2470	218	11	7.2	3.1	5.1
4.	"	198 11000	2440	191	12	9.7	3.6	5.5
5.	"	200 11110	2335	175	13	13.5	4.0	4.9
6.	"	196 10890	2215	158	13	15.7	5.8	5.9
7.	"	199 11050	2335	146	16	18.0	7.4	5.5
8.	"	197 10950	1910	142	13	18.6	7.8	5.5
9.	"	191 10610	1770	126	14	25.1	8.3	5.5

AM = Ausgangsmedium

AB = Abnahme

Tab.1: Ergebnisse zur Funktion der im Recycling isoliert perfundierten Rattenleber ohne Indomethacinserin.

Gesamtvolumen des Perfusionsmediums: 200 ml

Gesamtperfusionsdauer: 120 Minuten, Vorperfusion: 30 Minuten

Aus den Meßergebnissen in Tabelle 1 geht hervor, daß die Glucose- und Kalium-Konzentrationen praktisch konstant blieben. Da - wie oben erwähnt - der L/P-Quotient im Perfusionsmedium Ausdruck des L/P-Quotienten des Lebergewebes ist und unter physiologischen Bedingungen ein L/P-Quotient von 10 - 20 gemessen wird, kann man aus den in Tabelle 1 gezeigten Meßergebnissen auf einen physiologischen Redoxzustand der perfundierten Leber schließen.

5.12 Untersuchung an der isoliert perfundierten Leber mit Indomethacinserin -----

Nach Beendigung der 30 Minuten dauernden Vorperfusion zur Stabilisierung der Leberfunktionen erfolgte jeweils die Zugabe von C-14 Indomethacinserin. Im Abstand von 10, 20, 60 und 90 Minuten nach Substanzzugabe wurden aus dem Perfusionsmedium Proben für Kontrollmessungen von K^+ , Glucose, Lactat, Pyruvat, GOT und GPT sowie zur Messung des Metabolitenverteilungsmuster entnommen.

Die C-14 Aktivität der von der Leber ausgeschiedenen und gesammelten Gallenflüssigkeit, die C-14-Aktivität der Leber selbst sowie die des Restperfusates wurden zusätzlich gemessen. In der Gallenflüssigkeit war ein relativ hoher Anteil der C-14 Aktivität nachweisbar. (Tab.2).

Perfusion	Galle ml	C-14-Aktivität in % der Eingabe in der Galle
1	0.83	33.8
2	0.95	28.0
3	0.72	27.1
4	0.79	30.4

Tab.2: C-14-Aktivität in % der Eingabe in der Galle in vier Perfusionen.

Die Gallenflüssigkeit wurde - wie oben beschrieben - gesondert aufgefangen. Die mit der Galle ausgeschiedene Radioaktivitätsmengen von ca. 27 - 34% der Eingabe wurden somit der Perfusion entzogen. Nach Beendigung der Perfusion wurde in vier Versuchen die C-14-Aktivität in der Leber bestimmt. Die C-14-Aktivität der Gesamtleber lag zwischen ca. 13 und 27% der zur Perfusion eingesetzten Radioaktivität (Tab.3).

Perfusion	Lebergewicht g	C-14-Aktivität in % der Eingabe in der Gesamtleber
1	9.1	12.9
2	8.9	27.2
3	10.3	26.5
4	8.4	15.3

Tab.3: C-14-Aktivität in % der Eingabe in der Gesamtleber nach Beendigung der Perfusion

Die in Galle und Leber nachgewiesene C-14-Aktivität ergibt zusammen 45 - 55% der eingegebenen Radioaktivität. Im Restperfusat wurde eine C-14-Aktivität zwischen 9.5 und 13.7% der Eingabe gemessen.

Bei der Extraktion des wäßrigen Perfusates mit Essigester verblieben zwischen 1 und 8% der Radioaktivität in der wäßrigen Phase, während 92 - 99% der C-14-Aktivität mit Essigester extrahierbar waren.

C-14-Aktivität in % der Eingabe	Perfusions Nr.			
	1	2	3	4
Galle	33.8	28.0	27.1	30.4
Leber	12.9	27.2	26.5	15.3
Restperfusat	11.0	9.5	10.1	13.7
Untersuchungsproben	11.5	10.1	8.9	12.8
Summe	69.2	74.8	72.6	72.2

Tab.4: Summe der C-14-Aktivität in % der Eingabe von Galle, Leber, Restperfusat und Untersuchungsproben in vier Perfusionen.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, ergibt sich nach Addition der C-14-Aktivität in der Galle, der Leber, dem Restperfusat und in den Untersuchungsproben im Mittel ein Wert von etwa 72% der eingesetzten Radioaktivität, also eine Wiederfindung von etwa 70- 75%.

5.13 Metabolisierung von C-14-Indomethacinserin durch die isoliert perfundierte Rattenleber

Wie auf Seite 26 beschrieben, wurde in vier Versuchen zeitabhängig die prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität im Perfusionsmedium auf Indomethacin und seine Metabolite nach chromatographischer Auftrennung der Extrakte bestimmt. Die Einzelwerte der vier Versuche für die prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität im Perfusionsmedium sind in Tabelle 5, die Mittelwerte sind graphisch in Abb.6 dargestellt.

Vergleichs- substanzen	Perfusionsdauer nach Indomethacinserin-Zugabe			
	10 Minuten	20 Minuten	60 Minuten	90 Minuten
Indomethacinserin	73.1 (70.1)	58.5 (65.3)	49.8 (59.4)	41.0 (53.0)
Indomethacin	1.0 (0.7)	1.4 (0.7)	2.7 (1.6)	3.8 (3.7)
Debenzoylindomethacinserin	2.4 (2.0)	2.7 (2.2)	3.0 (2.8)	4.4 (4.5)
Decarboxylindomethacinserin	0.6 (0.7)	0.6 (1.0)	1.0 (1.2)	1.2 (1.3)
Demethylindomethacin	-	0.2 (0.5)	0.6 (0.9)	0.9 (1.2)
Debenzoylindomethacin	0.6 (0.2)	1.1 (0.5)	1.0 (0.9)	1.6 (1.2)
Versuch 1 und (2)				
Indomethacinserin	65.7 (79.4)	39.8 (77.9)	32.7 (67.8)	27.4 (50.0)
Indomethacin	0.8 (0.5)	0.9 (1.6)	1.7 (2.8)	3.6 (3.7)
Debenzoylindomethacinserin	2.9 (1.8)	3.1 (2.5)	4.3 (3.3)	5.1 (5.5.)
Decarboxylindomethacinserin	0.5 (0.5)	0.5 (0.4)	1.0 (0.6)	0.9 (1.7)
Demethylindomethacin	- (0.4)	0.3 (0.7)	0.6 (0.4)	0.4 (1.2)
Debenzoylindomethacin	0.4 (0.4)	0.4 (0.6)	0.9 (0.4)	0.5 (1.8)
Versuch 3 und (4)				

Tab.5: Prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität nach DC-Auftrennung der aus dem Perfusionsmedium extrahierten radioaktiven Verbindungen.

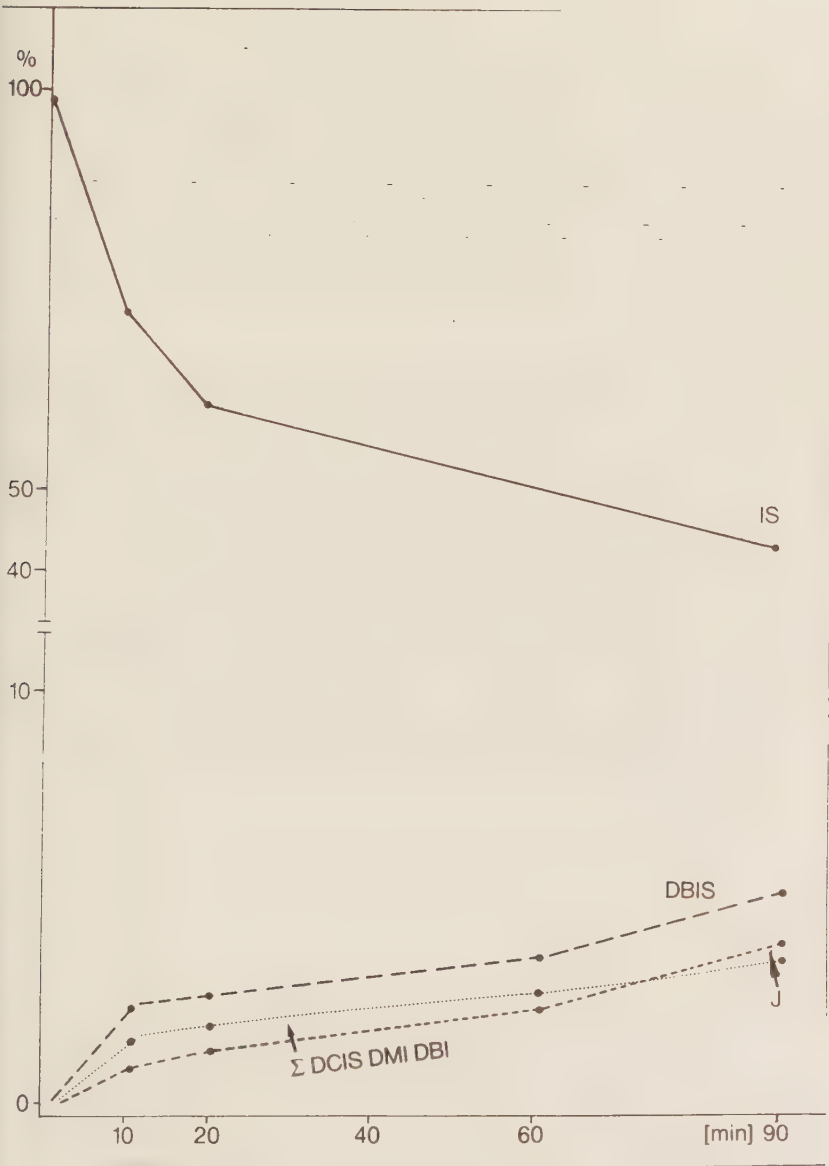


Abb.6: Mittlere prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität nach DC-Auftrennung der aus dem Perfusionsmedium extrahierten radioaktiven Verbindungen.

Aus Tabelle 5 und Abbildung 6 geht hervor, daß der Anteil des Indomethacin im Perfusionsmedium zwischen 10 und 90 Minuten um den Faktor 4 zunimmt und damit nach Debenzoylindomethacinserin die zweithöchste Konzentration der zuordenbaren Metabolite besitzt. Die Konzentration von Debenzoylindomethacinserin nahm um den Faktor 2 zu und erreichte den höchsten Anteil hinsichtlich der erfaßbaren Metaboliten.

Bereits zehn Minuten nach Substanzzugabe waren die zuordenbaren Metaboliten mit Ausnahme des Demethylindomethacin nachweisbar. In der Probe, die 20 Minuten nach Substanzzugabe entnommen wurde, konnte Demethylindomethacin dann nachgewiesen werden. Die Konzentration von Demethylindomethacin nahm zwischen 60 und 90 Minuten nur unwesentlich zu, was für das Decarboxylindomethacinserin und das Debenzoylindomethacin ebenso zutraf. Der Anteil der chromatographisch den Vergleichssubstanzen zuordenbaren radioaktiven Verbindungen nimmt mit der Dauer der Perfusion ab. Die Abnahme ist an einem Beispiel für Perfusion Nr.1 der Tabelle 5 graphisch dargestellt (Abb.7)

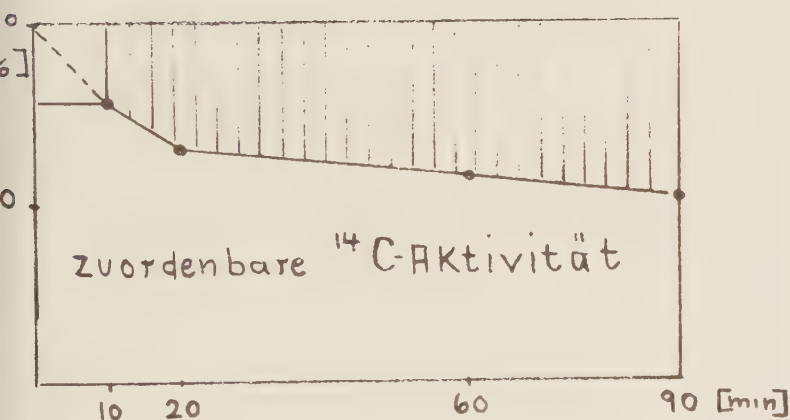


Abb.7: Zuordenbare C-14-Aktivität im Perfusionsmedium bei der Perfusion der isoliert perfundierten Rattenleber mit C-14 Indomethacinserin.

5.2.0 In vivo Pharmakokinetik von C-14 Indomethacinserin bei der Ratte-----

5.2.1 Gesamt-C-14-Aktivität in Urin und Fäces der Ratte nach oraler Applikation von C-14-markiertem Indomethacinserin-----

Vier männliche Wistar-Ratten erhielten je 1.1 mg C-14 Indomethacinserin per os. Sie wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten, so daß Urin und Fäces getrennt gesammelt werden konnten und Koprophagie verhindert wurde.

Die C-14-Elimination über Urin und Fäces ist in Tabelle 6 und 7 sowie in Abbildungen 8 und 9 aus vier Versuchen dargestellt.

Sammel- periode (h)	1	2	3	4	Mittel- wert	% der Eingabe kumulativ
0 - 6	2.1	2.8	1.6	0.2	1.7	
6 - 12	3.4	4.0	3.3	2.9	3.4	5.1
12 - 24	10.1	11.2	6.7	7.0	8.6	13.7
24 - 32				2.1	2.1	15.8
32 - 48				2.0	2.0	17.8

Tab.6: C-14-Aktivität im Urin der Ratte (1-4) nach oraler Applikation von 1.1 mg C-14 Indomethacinserin in % der Eingabe

Sammelperiode (h)	1	2	Mittel- wert	% der Ein- gabe kumul.
0 - 12	12.4	10.6	11.5	
12 - 24	6.0	5.7	5.9	17.4

Tab.7: C-14-Aktivität in den Fäces der Ratten 1 + 2 nach oraler Applikation von 1.1 mg C-14 Indomethacinserin in % der Eingabe

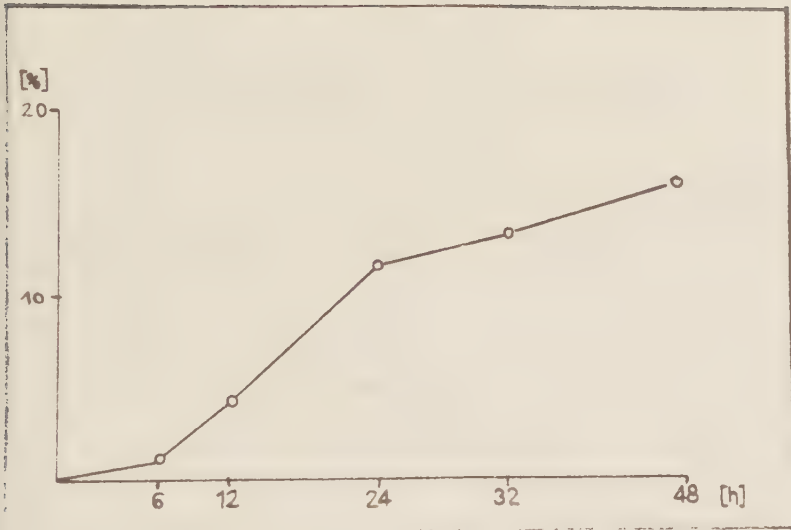


Abb.8: Kumulative Darstellung der mittleren C-14-Aktivität im Urin der Ratten 1-4 in % der Eingabe nach oraler Applikation von 1.1 mg C-14 Indomethacinserin.

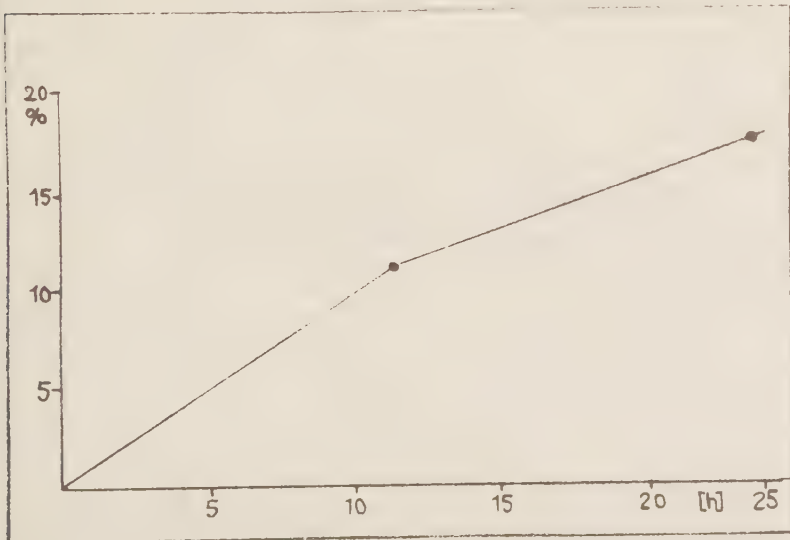


Abb.9: Kumulative Darstellung der mittleren C-14-Aktivität in der Fäces der Ratten 1-2 in % der Eingabe nach oraler Applikation von 1.1 mg C-14 Indomethacinserin.

Die vorstehend beschriebenen Versuche zeigen, daß nach oraler Applikation von C-14 Indomethacinserin in 24 Stunden annähernd 15%, in 48 Stunden etwa 18% der Eingabe über den Urin ausgeschieden werden.

Mit den Fäces werden in 24 Stunden ca.15-20% ausgeschieden, so daß die Ratte in 24 Stunden insgesamt 30-35% der verabreichten C-14-Aktivität über Urin und Fäces ausscheidet.

Entsprechend der in Tabelle 6 angegebenen Sammelperioden wurde der Urin von vier in Stoffwechselkäfigen getrennt gehaltenen Ratten portionsweise gesammelt und wie oben beschrieben mit Essigester extrahiert. Die mit Essigester extrahierbaren Anteile an C-14-Aktivität sind in Tabelle 8 dargestellt.

Sammelperiode (h)	Tier Nr.			
	1	2	3	4
0 - 6	92	90	95	92
6 - 12	90	92	96	98
12 - 24	93	95	95	94
24 - 48				92

Tab.8: Mit Essigester extrahierbare C-14-Aktivität im Urin der Ratte in % der Gesamtaktivität im Urin

5.2.2 Metabolitenverteilungsmuster im Rattenurin nach oraler Applikation von C-14-Indomethacinserin

Die aus den einzelnen Harnproben mit Essigester extrahierten radioaktiven Verbindungen wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die authentischen Vergleichssubstanzen zuordenbare Radioaktivität ist als Prozent der Gesamt-C-14 Aktivität der DC-Platte in Tabelle 9 und Abbildung 10 wiedergegeben.

Vergleichs- substanz	Sammelperioden				
	0 - 6 ^h	6 - 12 ^h	12 - 24 ^h	24-32 ^h	32-48 ^h
Indomethacinserin	23.0(20.0)	16.1(15.2)	13.0(12.2)		
Indomethacin	16.2(14.3)	22.0(25.2)	25.7(29.4)		
Benzoylindo- methacinserin	19.5(17.9)	14.2(15.2)	9,8(13.1)		
Carboxylindo- methacinserin	2.0(2.5)	2.9(1.3)	2.2(1.0)		
Methylindo- methacin	4.5(2.1)	4.0 (3.2)	3.5(2.0)		
Benzoylindo- methacin	12.0(8.7)	17.0(22.0)	24.8(27.7)		
Ratte 1 und (Ratte 2)					
Indomethacinserin	20.3(20.2)	14.4(11.0)	10.2(12.0)	(10.2)	(9.0)
Indomethacin	10.5(14.4)	18.2(18.6)	19.2(26.2)	(28.0)	(27.0)
Benzoylindo- methacinserin	21.0(18.0)	17.6(14.1)	12.7(12.3)	(10.2)	(9.0)
Carboxylindo- methacinserin	3.0(3.0)	3.4(3.9)	2.8(2.0)	(2.0)	(2.4)
Methylindo- methacin	7.1(5.5)	8.9(5.1)	5.1(3.3)	(4.4)	(2.7)
Benzoylindo- methacin	10.0(10.0)	15.4(28.4)	25.7(32.1)	(33.3)	(33.2)
Ratte 3 und (Ratte 4)					

Tab.9: Prozentuale Zuordnung der mit Essigester extrahierbaren radioaktiven Verbindungen im Urin der Ratte zu authentischen Vergleichssubstanzen nach dünnschichtchromatographischer Trennung

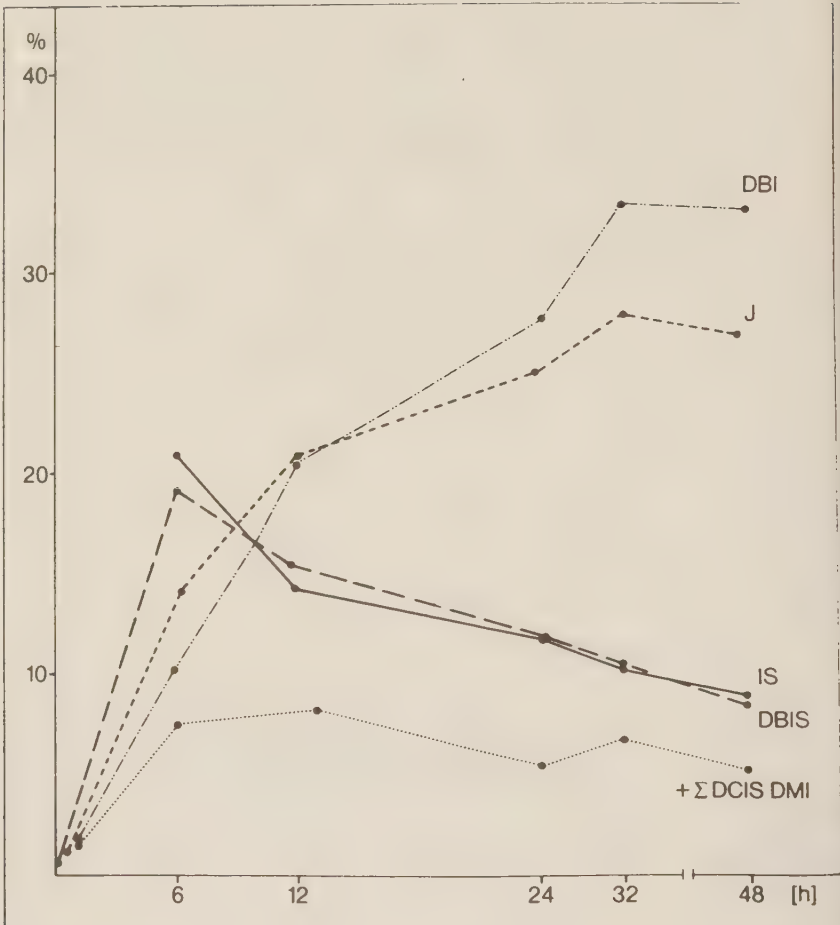


Abb.10: Mittlere prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität nach DC-Auftrennung der aus dem Rattenurin extrahierbaren radioaktiven Verbindungen.

In den ersten sechs Stunden nach oraler Applikation von 1.1 mg C-14 Indomethacinserin (IS) entfallen auf die Verbindungen Indomethacinserin (IS) und Debenzoylindomethacinserin (DBIS) etwa je 20% der in dieser Sammelperiode mit dem Rattenharn eliminierten radioaktiven Verbindungen. Auf die Verbindungen Indomethacin (I) und Debenzoylindomethacin (DBI) entfällt in den ersten sechs Stunden mit im Mittel 10 bzw. 14% ein deutlich geringerer Anteil der C-14-Aktivität im Urin.

Es ist bemerkenswert, daß schon ab der zweiten Sammelperiode (6 - 12 Stunden) die Verbindungen Indomethacin (I) und Debenzoylindomethacin (DBI) im Harn gegenüber den Verbindungen Indomethacinserin (IS) und Debenzoylindomethacinserin (DBIS) überwogen. Auf die Verbindungen De-methylindomethacin (DMI) und Decarboxylindomethacinserin (DCIS) entfielen über alle Sammelperioden etwa 7% der C-14-Aktivität im Harn.

5.30 Konstitutionsaufklärung

Die Identifizierung der anfallenden Metaboliten des Indomethacinserin sollte durch IR- und MS-Spektrum erfolgen. Dazu mußte pro Metabolit eine Mindestsubstanzmenge von etwa 1.5 mg in möglichst hochgereinigter Form zur Verfügung stehen.

In Vorversuchen, bei denen Ratten nach oraler Applikation von bis zu 30 mg/kg Körpergewicht Indomethacinserin seziert wurden, zeigte sich, daß die Tiere Schleimhautulcera, vorwiegend im Jejunum, entwickelten, deren Anzahl von der applizierten Menge Indomethacinserin und der Versuchsdauer abhängig war.

Daher erschien es sinnvoll, keine sehr hohen Dosen über lange Zeit zu geben. Die Versuchstiere erhielten einmalig 10 mg/kg Körpergewicht und wurden am dritten Tag getötet. Bei dieser Applikationsmenge traten keine oder nur wenige Schleimhautulcera auf. Von 60 Ratten wurden insgesamt 2.5 l Urin gesammelt. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Isolierung der einzelnen Metaboliten und zweimaligem Umkristallisieren in Essigester-Aether wurden folgende Substanzmengen isoliert:

Indomethacin	5.9 mg
Debenzoylindomethacinserin	1.1 mg
Decarboxylindomethacinserin	3.1 mg
Demethylindomethacin	4.1 mg
Debenzoylindomethacin	4.9 mg

Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit den Referenzverbindungen Indomethacin (I), Demethylindomethacin (DMI), Debenzoylindomethacin (DBI), Debenzoylindomethacinserin (DBIS) und Decarboxylindomethacinserin (DCIS) konnten Metaboliten chromatographisch zugeordnet werden. Darüber hinaus waren chromatographisch zwei weitere Metaboliten nachweisbar, deren Isolierung wegen zu geringer Menge nicht gelang. Sie werden in der folgenden Tabelle 10 als Metabolit X und Metabolit Y bezeichnet.

Metabolit	Rf-Wert	Referenzsubstanz
X	0.07	
1	0.12	Debenzoylindo- methacinserin
Ausgangssubstanz Indomethacinserin	0.34	Indomethacinserin
2	0.52	Decarboxylindo- methacinserin
3	0.62	Demethylindo- methacin
4	0.67	Debenzoylindo- methacin
5	0.75	Indomethacin
Y	0.85	

Tab.10: Rf-Werte von Indomethacinserin und der
Metaboliten des Indomethacinserin

Die Identifikation der isolierten Verbindungen erfolgte durch IR- und MS-Spektroskopie, wobei die Verbindungen in unveränderter Form sowie auch nach Überführung in das jeweilige Trimethylsilyl-(TMS)Derivat massenspektroskopisch untersucht wurde¹⁾.

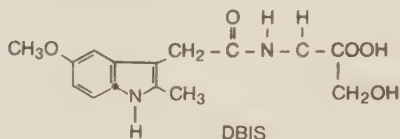
Die IR- und MS-spektroskopische Untersuchung führte zu folgenden Aussagen:

Metabolit 1: Das IR-Spektrum zeigt nur Banden von verschiedenen Begleitstoffen, hauptsächlich Silicagel, ein Metabolit ist nicht zu erfassen. Das Massenspektrum der unbehandelten Probe ist identisch mit dem der Referenz-

¹⁾ Ich danke Herrn Dr.HOYER, Departement Spektrometrie und Quantenchemie i.d.Fa.Schering AG für diese Untersuchung.

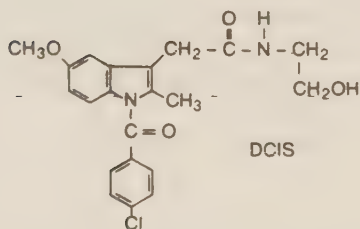
Referenzverbindung.

Ergebnis: Es liegt in starker Verunreinigung der Metabolit Debenzoylindomethacinserin vor.



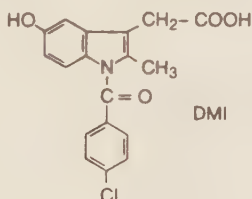
Metabolit 2: Das IR-Spektrum und die Massenspektren, sowohl der unbehandelten Verbindung als auch seines TMS-Derivats, sind mit den entsprechenden Referenzmusterspektren identisch.

Ergebnis: Es liegt in fast reiner Form der Metabolit Decarboxylindomethacinserin vor.



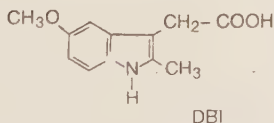
Metabolit 3: Das IR-Spektrum und die Massenspektren, sowohl der unbehandelten Verbindung als auch seines TMS-Derivates sind mit den entsprechenden Spektren der Referenzverbindung übereinstimmend.

Ergebnis: Es liegt in reiner Form Demethylindomethacin vor.



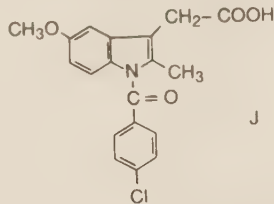
Metabolit 4: Das IR-Spektrum zeigt im wesentlichen die Banden von Na-Acetat; ein Metabolit ist nicht zu erkennen. Das Massenspektrum der unbehandelten Proben ist identisch mit dem der Referenzverbindung. Das Massenspektrum der silylierten Probe zeigt nur Peaks, die nicht von einem silylierten Metaboliten stammen.

Ergebnis: Es liegt in starker Verunreinigung der Metabolit Debenzoylindomethacin vor.

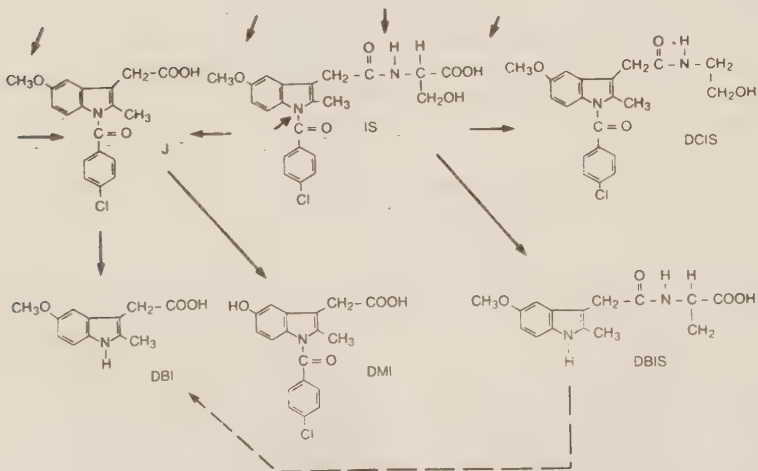


Metabolit 5: Das IR-Spektrum ähnelt sehr dem der Referenzverbindung, ist jedoch nicht identisch. Die Massenspektren, sowohl der unbehandelten Verbindung als auch seines TMS-Derivates, sind mit den entsprechenden Spektren der Referenzverbindung übereinstimmend.

Ergebnis: Es liegt in reiner Form der Metabolit Indomethacin vor, obwohl offenbar in einer anderen Kristallmodifikation.



Hiermit konnten im Urin der Ratte nach oraler Applikation von C-14 Indomethacinserin (IS) neben der Ausgangsverbindung Indomethacinserin fünf Metaboliten nachgewiesen werden.



Wie aus dem Vergleich der Abbildung 11 mit Abbildung 2 ersichtlich, konnten fünf von eingangs sechs als hypothetisch möglichen formulierten Metabolite des Indomethacinserin identifiziert werden. Wie Abbildung 11 zeigt, führte die Metabolisierung des Indomethacinserin in der isoliert perfundierten Rattenleber und in vivo bei der Ratte über folgende Abbauege zu den identifizierten Metaboliten:

1. N-Debenzoylierung von Indomethacinserin
—————→ Debenzoylindomethacinserin
2. Abspaltung des Serinteils von Indomethacinserin
—————→ Indomethacin
3. N-Debenzoylierung von Indomethacin
—————→ Debenzoylindomethacin
4. O-Demethylierung von Indomethacin
—————→ Demethylindomethacin
5. Decarboxylierung von Indomethacinserin
—————→ Decarboxylindomethacinserin.

6.0.0 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte der Metabolismus des Aminosäurederivates Indomethacinserin untersucht werden. Für diese Verbindungen war zuvor eine günstige Relation zwischen der erwünschten entzündungshemmenden und der unerwünschten ulcerogenen Wirkung nachgewiesen worden. Die Ratte wurde als Versuchstier ausgesucht, weil DUGGAN et al. (4/10) 1972 für Indomethacin zeigen konnte, daß der Abbaumodus dieser Substanz beim Menschen mit dem der Ratte vergleichbar ist.

Hauptziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob Indomethacinserin per se als Entzündungshemmer zu betrachten sei oder aber im Organismus metabolisch zunächst in Indomethacin umgewandelt werden müsse, um entzündungshemmend zu wirken, das heißt, ob Indomethacinserin im Sinne eines pro-drug zu betrachten sei. Da es das Ziel war, einen nicht steroidalen Entzündungshemmer zu finden, der gegenüber Indomethacin deutliche Vorteile, besonders im Hinblick auf geringere Nebenwirkungen haben sollte, gewann die Frage, ob Indomethacinserin per se wirkt oder als pro-drug zu betrachten ist, einen hohen Stellenwert.

Es war festgelegt, die weitere Bearbeitung des Indomethacinserin-Projektes zu beenden, falls Indomethacinserin ein pro-drug wäre. Denn in diesem Falle hätte man hinsichtlich klinischer Wirkungen und Nebenwirkungen mit dem vom Indomethacin bekannten Spektrum rechnen müssen.

Die wesentliche Aufgabe dieser Arbeit war es daher, durch Untersuchungen zum Metabolismus des Indomethacinserin bei der Ratte Hinweise zu bekommen, ob die an der Ratte festgestellte entzündungshemmende Wirkung (7) über Indomethacinserin per se oder aber über das möglicher-

weise als Metabolit entstehende Indomethacin erklärt werden konnte.

Zur Beantwortung dieser Frage sollte zunächst ein für in vivo-Bedingungen relevanteres Modell benutzt werden als es bei isolierten Zellbestandteilen, Homogenaten oder Leberschnitten gegeben ist. Es wurde daher mit der isoliert perfundierten Rattenleber gearbeitet. Mit den an der Rattenleber gewonnenen Ergebnissen sollte in einer zweiten Versuchsreihe der Stoffwechsel von C-14 Indomethacinserin in vivo nach oraler Applikation an der Ratte untersucht werden, um die Perfusionsbefunde zu stützen und zu erweitern.

Abschließend sollte dann im Falle einer erfolgreichen chromatographischen Charakterisierung der Metaboliten des Indomethacinserin an der isoliert perfundierten Rattenleber sowie im in vivo-Versuch aus dem Urin der Ratte in einer weiteren Untersuchungsreihe versucht werden, die zunächst nur analytisch-chromatographisch charakterisierten radioaktiven Verbindungen durch Verabreichung großer Mengen nicht markierten Indomethacinserins an der Ratte, Metabolite in solchen Mengen entstehen zu lassen, daß eine Isolierung im präparativen Maßstab aus dem Urin der Ratte möglich wäre. Eine physikalische Identifikation der isolierbaren Metabolite sollte dann versucht werden.

Um diese Frage - wie vorstehend skizziert - bearbeiten zu können, war es nötig, sich zunächst die Methodik der isoliert perfundierten Leber anzueignen. Dazu gehörte das Erlernen der Operationstechniken zur Vorbereitung der Rattenleber für die Perfusion. Zu Beginn der Arbeit wurden in Kenntnis des Indomethacinstoffwechsels (2, 3, 4, 5, 6, 11, 12) und unter Berücksichtigung üblicher Stoff-

wechselreaktionen im Intermediärstoffwechsel mögliche Stoffwechselprodukte des Indomethacinserin theoretisch formuliert (s.Seite 13) und auf Wunsch chemisch dargestellt¹⁾, um dann bei den geplanten Stoffwechseluntersuchungen neben dem Ausgangsmaterial Indomethacinserin Vergleichssubstanzen als mögliche Metabolite zu haben.

Nach Aneignung der Methode der isoliert perfundierten Rattenleber und vor den eigentlichen Stoffwechseluntersuchungen an der Leber wurden Versuche zur Funktionsfähigkeit des Modells durchgeführt.

Als Parameter für den physiologischen Zustand der Leber hatten sich der L/P-Quotient und die Bestimmung der Enzyme GOT, GPT als brauchbar erwiesen (13, 14, 15, 16). Die Leber muß in der Lage sein, bei einem unterschiedlichen Angebot von Lactat/Pyruvat im Perfusionsmedium einen in vivo-Verhältnissen entsprechenden L/P-Quotienten von ca. 10 - 20 einzustellen. Der L/P-Quotient sagt etwas aus über den intrazellulären Redoxzustand des Hepatozyten, Er ist damit wesentlicher Parameter für den intermediären Stoffwechselzustand der Zelle. Eine wie immer geartete Entgleisung des Stoffwechsels der Leberzelle äußert sich in einem deutlich Anstieg des L/P-Quotienten.

Neben dem L/P-Quotienten als Meßgröße für den intrazellulären Redoxzustand der Leber ist die Konzentration der Enzyme GOT und GPT ein wichtiger Parameter für die Intaktheit der Leberzellmembranen.

1) Ich danke Herrn Dr.BIERE vom Departement Arzneimittelchemie I i.d.Fa.Schering AG.

Aus einleitenden Untersuchungen ging hervor, daß unter den angewandten Perfusionsbedingungen über einen Zeitraum von 120 Minuten - wie Tabelle 1 auf Seite 32 zeigt - der L/P-Quotient nur bis maximal 16 ansteigt. Die Enzyme GOT und GPT liegen ebenfalls in physiologischen Bereichen. Es konnte von STAIB (15) gezeigt werden, daß bei einer Überschreitung der Perfusionszeit über 120 Minuten hinaus der L/P-Quotient über 20 ansteigt und somit einen erhöhten Hydrierungsgrad und eine unphysiologische Abweichung anzeigt. Aus diesem Grunde wurden alle Perfusionen nur bis zu einer Gesamtdauer von 120 Minuten durchgeführt.

Aus technischen Gründen wurde zur Vereinfachung der Extraktion mit erythrozytenfreiem Perfusionsmedium gearbeitet. Um unter diesen Bedingungen eine optimale O₂-Versorgung der Leber zu gewährleisten, ist eine hohe Durchströmungsgeschwindigkeit erforderlich. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde mit einer Durchströmungsgeschwindigkeit von 4 ml pro 1 g Lebergewebe pro Minute gearbeitet. Bei einem durchschnittlichen Lebergewicht von 10 g wurde die isolierte Leber somit von ca. 40 ml Medium durchströmt. Aus hier nicht einzeln aufgeführten Untersuchungen geht hervor, daß bei dieser hohen Durchströmungsgeschwindigkeit der isolierten Leber der Funktionszustand der gleiche war wie mit erythrozytenhaltigem Medium bei geringerer Durchströmungsgeschwindigkeit.

Bei den Stoffwechseluntersuchungen an der isoliert perfundierten Leber wurde mit C-14 markiertem Indomethacinserin gearbeitet, um die Suche nach möglichen Metaboliten zu erleichtern. Die C-14-Markierung wurde im Indolring vorgenommen, weil Indol als Grundgerüst für Indomethacinserin und Indomethacin und der hypothetischen Metaboliten zu betrachten ist.

In 200 ml Perfusionsmedium wurde 1.1 mg radioaktives Indomethacinserin mit 20 µCi C-14 gegeben. 10, 20, 60

und 90 Minuten nach Zugabe des C-14 Indomethacinserin. zum Perfusionsmedium wurden aus dem Medium jeweils 25 ml Perfusat zur Analytik entnommen. Die anfallende Gallenflüssigkeit wurde zur Messung der Gesamt-C-14-Aktivität über die gesamte Perfusionszeit gesammelt.

Wie in Tabelle 4 (Seite 35) gezeigt, wurden insgesamt von der zur Perfusion eingesetzten C-14-Aktivität bei den verschiedenen Versuchen etwa 70 - 75% wiedergefunden. Es ist bemerkenswert, daß der größte Teil davon in der Gallenflüssigkeit auftrat. Die Tabelle 2 (Seite 27) zeigt, daß in vier Versuchen zwischen ca. 27 bis 34% der C-14-Aktivität über die Galle eliminiert wurden. Ca. 10% der eingesetzten Radioaktivität waren in den zur Analytik entnommenen Proben des Perfusionsmediums enthalten. Weitere ca. 10% verblieben in dem nicht aufgearbeiteten Perfusionsmedium (Restperfusat).

Der C-14-Anteil in der Leber nach Beendigung der Perfusion schwankte deutlich bei den verschiedenen Versuchen zwischen 13 und 27% .

Die Gallenflüssigkeit wurde nicht näher untersucht, so daß hier keine Aussagen möglich sind zu der Frage, ob es sich bei der mit der Galle eliminierten Radioaktivität um unverändertes Indomethacinserin und/oder Metabolite handelt. Aus der hohen C-14-Aktivität in der Galle kann man schließen, daß nach oraler Verabreichung von C-14 Indomethacinserin bei der Ratte möglicherweise ein ausgeprägter enterohepatischer Kreislauf stattfindet, ohne daß diese Aussage durch weitere Untersuchungen in dieser Arbeit belegt werden könnte.

Da aus der Literatur bekannt ist, daß Indomethacin bei der Ratte in hohem Maße über die Galle ausgeschieden wird (4, 6, 8), liegt es nahe, anzunehmen, daß es sich auch

bei den hier vorliegenden Untersuchungen in der Galle im wesentlichen um Indomethacin handeln könnte.

Die prozentuale Verteilung der C-14-Aktivität im Perfusionsmedium zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ist in Abbildung 6 (Seite 37) dargestellt. Die Verteilung der C-14-Aktivität auf Indomethacinserin und seine Abbauprodukte im Perfusionsmedium wurde durch dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Essigester-extrakte bestimmt.

Aus dem Perfusionsmedium waren im Mittel 95% der C-14-Aktivität mit Essigester extrahierbar. Daraus kann man ableiten, daß der Anteil von konjugierten, wasserlöslichen Metaboliten sehr gering ist. In Abbildung 6 ist die prozentuale Verteilung der aus dem Perfusionsmedium extrahierbaren radioaktiven Verbindungen graphisch dargestellt.

Es ist bemerkenswert, daß die Konzentration von unverändertem Indomethacinserin im Medium zunächst sehr rasch abfällt, so daß nach 20 Minuten nur noch ca. 60% an unverändertem Indomethacinserin im Perfusionsmedium nachweisbar waren. Danach fällt die Indomethacinserin-Konzentration bis zur 90. Minute deutlich langsamer ab und beträgt am Ende der Gesamtperfusionsdauer (120 Minuten) noch etwa 43% der Ausgangskonzentration. Im Hinblick auf die zu bearbeitende Fragestellung wurde dieser Befund nicht näher analysiert. Man könnte sich den initialen raschen Abfall über eine Verteilung von C-14-Aktivität im extra- und intrazellulären Raum der Leber vorstellen. Darüber hinaus könnte in den ersten 20 Minuten ein höherer Anteil über die Galle eliminiert und daher dem Medium entzogen werden.

Da die Galle nicht fraktioniert gesammelt und nur am Ende der Perfusion die C-14-Aktivität bestimmt wurde, ist eine nähere Aussage nicht möglich, ob durch unterschiedlichen Gallenfluß im Verlauf der Gesamtperfusion zumindest teilweise die unterschiedliche Abklingrate von unverändertem Indomethacinserin erklärbar ist.

Bei der chromatographischen Auftrennung der Essigester-extrakte waren neben Indomethacinserin zunächst nur in geringer Menge, mit der Zeit aber in zunehmendem Maße, radioaktive Verbindungen nachweisbar. Anhand der Vergleichssubstanzen war es möglich, diese radioaktiven Verbindungen dünn-schichtchromatographisch den Metaboliten Debenzoylindomethacinserin (DBIS), Decarboxylindomethacinserin (DCIS), Demethylindomethacin (DMI), Debenzoylindomethacin (DBI) und Indomethacin (I) zuzuordnen.

Aus Abb.6 geht hervor, daß am Ende der Perfusion die Metaboliten Debenzoylindomethacinserin (DBIS) und Indomethacin (I) eine Konzentration von je etwa 5% der aus dem Perfusionsmedium extrahierbaren C-14-Aktivität erreichten, während die Metaboliten Decarboxylindomethacinserin (DCIS), Demethylindomethacin (DMI) und Debenzoylindomethacin (DBI) zusammen nur in einer Konzentration von unter 5% der C-14-Aktivität vorlagen. Damit waren am Schluß der Perfusion insgesamt ca. 60% der eingesetzten C-14-Aktivität zuordenbar.

Zusammenfassend kann im Hinblick auf die eingangs gestellte Frage zu den Untersuchungen an der perfundierten Leber festgestellt werden, daß die Ratte offensichtlich in der Lage ist, Indomethacinserin (IS) zu Indomethacin(I) abzubauen.

Zur Erweiterung der an der isoliert perfundierten Rattenleber erhaltenen Befunde zum Stoffwechsel des Indomethacinserin wurden Versuche an der Ratte durchgeführt. Dabei wurde C-14 markiertes Indomethacinserin oral verabreicht. Zur Bestimmung der Gesamt-C-14-Elimination wurden Urin und Stuhl getrennt bis zu 48 Stunden gesammelt. Untersuchungen zum Metabolitenspektrum wurden im Urin der Ratten durchgeführt.

Über Urin und Stuhl der Ratte wurden insgesamt über einen Zeitraum von 24 Stunden 30 - 35% der C-14-Aktivität zu etwa gleichen Teilen ausgeschieden. Von YESAIR (6, 12) und DUGGAN (4) wurde für Indomethacin über einen Zeitraum von 24 Stunden ebenfalls eine Ausscheidung über Fäces und Urin im Verhältnis 1:1 beschrieben.

Demgegenüber gibt HUCKER (3) eine Verteilung der radioaktiven Gesamtausscheidung über Fäces und Urin im Verhältnis von 1:4 an.

Die Verteilung der Radioaktivität im Harn wurde wie im Perfusionsmedium durch dünnenschichtchromatographische Auftrennung der mit Essigester extrahierten C-14-Verbindungen bestimmt. Die Analytik wurde auf die Essigesterextrakte beschränkt, da mit diesem Lösungsmittel ungefähr 90% der im Harn vorhandenen C-14-Aktivitäten extrahierbar waren. Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Harn wurde in vier getrennt durchgeführten Versuchen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 auf Seite 44 graphisch dargestellt.

Es fällt auf, daß in den ersten sechs Stunden der größte Teil der zuordenbaren Radioaktivitäten im Harn mit je etwa 20% auf unverändertes Indomethacinserin und das Debenzoylindomethacinserin entfallen. Der danach quantitativ wichtigste Metabolit des Indomethacinserin ist mit etwa 15% das Indomethacin. Im 6-Stunden-Sammelurin entfallen auf Debenzoylindomethacin im Mittel 10%, auf die restlichen zuordenbaren Metaboliten Decarboxylindo-

methacinserin (DCIS) und Demethylindomethacin (DMI) zusammen etwa 8%.

Besonders bemerkenswert ist, daß es mit zunehmender Zeit im Urin zu einem starken Überwiegen von Debenzoylindomethacin (DBI) und Indomethacin (I) kommt, so daß in dem nach 32 und 48 Stunden nach oraler Verabreichung von C-14-Indomethacinserin gesammelten Urin auf Debenzoylindomethacin (DBI) ca. 33% und Indomethacin (I) ca. 27% entfallen, wogegen auf die in den ersten sechs Stunden überwiegend im Harn vorhandenen Verbindungen Indomethacinserin (IS) und Debenzoylindomethacinserin (DBIS) nur noch etwa je 10% der Radioaktivität entfallen.

Aus diesen Untersuchungen könnte man mit aller Vorsicht ableiten, daß sich die Kinetik von Indomethacin und Debenzoylindomethacin auf der einen Seite und die Kinetik der Verbindungen Indomethacinserin und Debenzoylindomethacinserin auf der anderen Seite deutlich unterscheiden.

Es hat den Anschein, daß der wesentliche Unterschied in der Kinetik zwischen diesen beiden Paaren durch den Serinrest bedingt ist, in dem Sinne, daß offensichtlich Indomethacin amidartig verknüpft mit Serin, wesentlich rascher eliminiert wird und daß nach metabolischer Abspaltung des Serinrestes das entstehende Debenzoylindomethacin bzw. Indomethacin eine längere Verweilzeit in der Ratte besitzt. Dabei spielt der Benzoylrest offensichtlich eine untergeordnete Rolle.

Die in Abbildung 10 (Seite 44) dargestellten Ergebnisse könnten im folgenden Sinne interpretiert werden:

Nach oraler Verabreichung von C-14-Indomethacinserin überwiegt bei der Ratte zunächst metabolisch die Debenzoylierung zum Debenzoylindomethacinserin.

Aus Indomethacinserin und Debenzoylindomethacinserin entstehen durch Abspaltung des Serinrestes Indomethacin bzw. Debenzoylindomethacin. Durch die Abspaltung des Serinrestes dürfte die Verweilzeit der beiden Verbindungen Indomethacin und Debenzoylindomethacin im Organismus verlängert werden.

Die beiden Metaboliten Decarboxylindomethacinserin und Demethylindomethacin, deren Menge im Harn über die gesamte Untersuchungszeit mit etwa je 4% der Radioaktivität in den Harnproben gleich ist, wurden aus der vorstehenden Betrachtung ausgeklammert.

Bei den Perfusionsversuchen war nach 90 Minuten Indomethacin zu etwa 5% im Perfusionsmedium enthalten, so daß eine Erklärung der starken entzündungshemmenden Wirkung des Indomethacinserin als Indomethacinwirkung aufgrund der Perfusionsversuche kaum möglich schien.

Die Untersuchungen zum in vivo-Stoffwechsel des Indomethacinserin zeigen nun, daß in den ersten Stunden nach Verabreichung von C-14-Indomethacinserin zwar ebenfalls nur relativ wenig Indomethacin im Harn auftritt, daß dieses aber mit zunehmender Untersuchungszeit stark ansteigt. Wenn man berücksichtigt, daß in Kurzzeitentzündungstesten, bei denen bereits drei Stunden nach Substanzzugabe die entzündungshemmende Wirkung gemessen wird, Indomethacinserin im Vergleich zu Indomethacin weniger wirksam ist, daß aber in Langzeittesten beide Verbindungen praktisch gleich wirksam sind (7), dann kann man aus den in vivo-Ergebnissen im Gegensatz zu den Perfusionsergebnissen ableiten, daß bei der Ratte für die systemische entzündungshemmende Wirkung des Indomethacinserin das Indomethacin verantwortlich ist.

Für die aus den in vivo-Versuchen abgeleitete Annahme, daß Indomethacinserin per se nicht entzündungshemmend wirkt und daß vielmehr seine entzündungshemmende Wirkung auf das im Stoffwechsel entstehende Indomethacin zurückzuführen ist, sprechen weitere Befunde, die nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (7).

Es wurde nämlich gezeigt, daß Indomethacinserin im Gegensatz zu Indomethacin nicht die Prostaglandinsynthetase hemmt. Da von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, die sogenannten klassischen Entzündungshemmer alle Prostaglandinsynthetasehemmer sind (17, 18, 19, 20), kann man annehmen, daß Indomethacinserin per se nicht entzündungshemmend wirkt. Dafür spricht weiterhin der Befund, daß mit Indomethacinserin im Gegensatz zu Indomethacin und anderen klassischen Entzündungshemmern keine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung stattfindet (17, 18, 19, 20).

Die in den Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber und im Rattenharn beschriebenen Metaboliten des Indomethacinserin wurden anhand von authentischen Testsubstanzen zunächst chromatographisch charakterisiert. Zur Identifikation der chromatographisch-charakterisierten radioaktiven Verbindungen wurden insgesamt 2.5 l Harn von Ratten aufgearbeitet, die hohe Dosen Indomethacinserin oral erhalten hatten.

Die über Säulenchromatographie und mehrmalige Dünnschichtchromatographie gereinigten Verbindungen wurden in geeigneten Lösungsmittelgemischen mehrfach umkristallisiert. Die Identifikation der aus Rattenharn isolierten Verbindungen erfolgte durch IR- und MS-Spektroskopie.

Durch diese Untersuchungen wurde die im analytischen Teil der Arbeit durch Chromatographie erfolgte Charakterisie-

rung der Verbindungen bestätigt.

Aus dem Harn wurden folgende Metabolite identifiziert: Indomethacin (I), Debenzoylindomethacinserin (DBIS), Demethylindomethacin (DMI), Debenzoylindomethacin (DBI), Decarboxylindomethacinserin (DCIS). Neben den charakterisierten und identifizierten Verbindungen waren dünn-schichtchromatographisch im Rattenharn zwei weitere in der vorliegenden Arbeit mit X und Y bezeichnete radioaktive Verbindungen nachweisbar. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens ist der mit X bezeichnete Metabolit sehr stark polar, das heißt relativ hydrophil und wandert chromatographisch noch langsamer als der polarste identifizierte Metabolit Debenzoylindomethacinserin (DBIS). Ob es sich bei dieser Verbindung X um eine geringe Menge eines konjugierten, das heißt wasserlöslichen Metaboliten handelt, ist aus diesen Untersuchungen nicht ableitbar.

Die mit Y bezeichnete radioaktive Verbindung zeichnet sich chromatographisch durch eine besonders hohe Wanderungsgeschwindigkeit aus. Die Verbindung Y hat von den chromatographisch nachweisbaren radioaktiven Verbindungen mit 0.8 den größten Rf-Wert und dürfte damit in dem mit Eisessig angesäuerten Toluol als Fließmittel eine höhere Löslichkeit besitzen als Indomethacin, das in diesem System einen Rf-Wert von 0.75 besitzt.

Für Indomethacin hatten YESAIR et al. (6, 12) in der Galle von Ratten neben den bekannten, von verschiedenen Autoren (2, 3, 4, 5, 8) beschriebenen Metaboliten einen Metaboliten X gefunden, der von ihnen nicht identifiziert werden konnte.

Aufgrund hier beschriebener Untersuchungen sind folgende Stoffwechselschritte am Indomethacinserinmolekül als gesichert betrachtet worden:

1. Abspaltung des Parachlorbenzoylrestes am Indolstickstoff.
2. Spaltung der Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Indomethacin und der Aminogruppe des Serin.
3. Abspaltung der Methylgruppe aus der Methoxygruppe.
4. Abspaltung der freien Carboxylgruppe im Indomethacinserin.

Über die einzelnen Stoffwechselschritte und die daran beteiligten Enzyme bzw. Enzymsysteme wurden in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt, so daß weder hinsichtlich der Enzyme noch deren Lokalisation innerhalb der Zelle eine Aussage möglich ist.

Da die Metabolite sowohl im Harn der Ratte als auch im Perfusionsmedium nachweisbar waren, kann man schließen, daß die beschriebenen Stoffwechselschritte in der Ratteleber erfolgen, ohne aber sagen zu können, ob in anderen Geweben gleiche und/oder zusätzliche Stoffwechselschritte in geringem Maße möglich sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die eingangs gestellte Frage, ob Indomethacinserin per se entzündungshemmend wirkt oder aber als pro-drug zu betrachten ist, in dem Sinne beantwortet werden kann, daß unter Berücksichtigung der in vivo-Versuche an der Ratte zur entzündungshemmenden Wirkung (7) von Indomethacinserin und unter Berücksichtigung von biochemischen in vitro-Versuchen Indomethacinserin offensichtlich per se nicht entzündungshemmend wirkt. Alle Befunde sprechen dafür, daß Indomethacinserin als pro-drug zu betrachten ist und in vivo, zumindest bei der Ratte, in beträchtlichem Umfang in Indomethacin als Wirkform umgewandelt wird. Da man annehmen darf, daß die Überführung von

Indomethacinserin in Indomethacin durch Amidspaltung beim Menschen ebenso wie bei der Ratte stattfinden dürfte, ist der Schluß erlaubt, daß aus dem per se offensichtlich unwirksamen Indomethacinserin auch beim Menschen als Wirkform das Indomethacin entstehen würde.

Die vorgestellten Ergebnisse der Untersuchung zum Stoffwechsel des Indomethacinserin an der Ratte führten zu der Entscheidung, auf weitere Untersuchungen mit Indomethacinserin mit dem Ziel einer Anwendung beim Menschen zu verzichten, da aufgrund der Ergebnisse das Indomethacinserin als pro-drug bezeichnet werden muß und somit keine wesentlichen Vorteile gegenüber dem Indomethacin als der wahrscheinlich wesentlichen Wirkform erwartet werden konnten.

7.0.0 ZUSAMMENFASSUNG

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, durch Untersuchungen über die Stoffwechselvorgänge des Indomethacinserin zu klären, ob Indomethacinserin per se als Entzündungshemmer zu betrachten ist oder aber im Organismus zu Indomethacin metabolisiert wird. In diesem Falle wäre Indomethacinserin als pro-drug anzusehen.

Durch Versuche an der isoliert perfundierten Rattenleber und an der Ratte in vivo konnten fünf Metabolite des Indomethacinserin mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wahrscheinlich gemacht werden. Deren Identifizierung gelang durch IR- und MS-Spektroskopie.

Für die in vitro- und in vivo-Untersuchungen wurde im Indolring C-14 markiertes Indomethacinserin verwendet.

Sowohl bei den Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenleber als auch an der Ratte in vivo trat Indomethacin als Hauptmetabolit auf.

Indomethacinserin kann somit als pro-drug bezeichnet werden. Die an der Ratte beschriebene entzündungshemmende Wirkung des Indomethacinserin dürfte aufgrund der vorliegenden Befunde auf das durch Amidspaltung aus Indomethacinserin entstehende Indomethacin zurückzuführen sein.

8.0.0 LITERATURVERZEICHNIS

1. SHEN, T.Y., T.B.WINDHOLZ, A.ROSEGAY
Anti-inflammatory agents.
Amer.chem.Soc. 85, 488 (1963)
2. DUGGAN, D.E., A.E.W.DUNCAN
The metabolism of indomethacin-C¹⁴ in normal
and salicylate treated rats.
Pharmacologist 12, 202 (1970)
3. HUCKER, H.B., A.G.ZACCHEI, S.V.COX, D.A.BRODIE,
N.H.R.CANTWELL
Studies on the absorption, distribution and
excretion of indomethacin in various species.
J.Pharmacol.exp.Therap. 153, 237 (1966)
4. DUGGAN, D.E., K.F.HOOKE, R.M.NOLL, K.Ch.KWAN,
Enterohepatic circulation of indomethacin
and its role in intestinal irritation.
Biochem.Pharmacol. 25, 1749 (1975)
5. HARMAN, R.E., M.A.P.MEISINGER, G.E.DAVIS, F.A.
KUEHL jr.
The metabolites of indomethacin, a new anti-
inflammatory drug.
J.Pharmacol.exp.Therap. 143, 215 (1964)
6. YESAIR, D.W., M.CALLAHAN, L.REMINGTON, C.J.KENSLER
Role of the entero-hepatic cycle of indomethacin
on its metabolism, distribution in tissues and
its excretion by rats, dogs and monkeys.
Biochem.Pharmacol. 19, 1579 (1970)

7. KAPP, W., J. BÜTTCHER
Jahrestagung 1977 der G D Ch, Fachgruppe medizinische Chemie vom 12.-14. September in München.
Pharmakodynamik, Toxikologie und Kinetik von Sermethacin, einem Serinderivat des Indomethacin.
8. HOGANS, A.F., K.F. HOOKE, D.E. DUGGAN
Metabolism of ^{14}C -Indomethacin (In) in the rat and the influence of agents capable of antagonizing the pharmacological activity.
Pharmacologist 13, 237 (1971)
9. DUGGAN, D.E., A.F. HOGANS, K.C. KWAN, McMAHON
The metabolism of indomethacin in man.
J. Pharmacol. exp. Therap. 181, 563 (1972)
10. HVIDBERG, E., H.H. LAUSEN, J.A. JANSEN.
Indomethacin: Plasma concentrations and protein binding in man.
Europ. J. clin. Pharmacol. 4, 119 (1972)
11. YESAIR, D.W., L. REMINGTON, M. CALLAHAN, C.J. KENSLE
Comparative effects of salicylic acid, phenylbutazone, probenecid and other anions on the metabolism, distribution and excretion of indomethacin by rats.
Biochem. Pharmacol. 19, 1591 (1970)
12. SCHIMASSEK, H.
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber.
Biochem. Zschr. 336, 460 (1963)

13. SCHIMASSEK, H.
Regulation of lactate and pyruvate levels in perfusion medium by the isolated rat liver.
Life Sciences 11, 635 (1962)
14. STAIB, W., R. SCHOLZ
Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1968
15. FRIMMER, M., R. KRAMER
Kationenbewegungen in der isoliert perfundierten Rattenleber.
Z. ges. exp. Med. 152, 269 (1970)
16. FAMAHEY, J. P., J. MOCKEL
Importance of sulfhydryl groups for the uncoupling activity of non-steroidal acidic anti-inflammatory drugs and valinomycin in oxidative phosphorylation.
Biochem. Pharmacol. 22, 1487 (1973)
17. VANE, J. R.
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.
Nature New Biology 231, 232 (1971)
18. ALVIN, J., E. GOH, M. T. BUSH
Study of the hepatic metabolism of promidone by improved methodology.
J. Pharmacol. exp. Therap. 194, 117 (1975)
19. KOLAR, G. F., J. SCHLESINGER
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.
Chem. Biol. Interactions 14, 301 (1976)

20. KU, E.C., J.M. WASWARY, W.D. CASH
Diclofenac sodium, a potent inhibitor of
prostaglandin synthetase.
Biochem. pharmacol. 24, 641 (1975)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr.Dr.E. G e r h a r d s im Forschungslabor des Departement Entzündungspharmakologie der Fa.Schering AG Berlin durchgeführt.

Die Anregungen, die ich in gemeinsamen vertiefenden Gesprächen mit Herrn Professor Gerhards erhielt, prägten entscheidend die endgültige Gestalt dieser Arbeit. Ich bin ihm zu tiefem Dank verpflichtet.

Die fortlaufende Betreuung lag in den Händen von Frau Dr.I. B ö t t c h e r. Ich danke ihr sehr herzlich für ihre konstruktive Kritik.

Für die geschickte Assistenz und für viele praktische Ratschläge bei der Durchführung der Perfusionsversuche danke ich Frau M.K n a b e - R ü h l und Frau M. U l l r i c h (Fa.Schering AG).

LEBENS LAUF

Name: Ilonka S c h u c h

Geboren: 4. Juni 1939 in Wuppertal

Eltern: Mally und Ernst Schuch

Schulen: 1946 - 1949 Volksschule
1949 - 1956 Gymnasium (Neusprachlich)

Ausbildung: 1956 - 1957 Chemiepraktikum Fa.Ch.Boehringer/
Ingelheim
1957 - 1960 Fachschule für Chemie Landau /Pfalz
Abschluß: Chemotechnikerin

Berufstätigkeit:
1960/61 Fa.E.Merck/Darmstadt
1961 - 1965 Fa.Eckes/Mainz

Hochschulreife:
1966 - 1968 Koblenz Kolleg/Koblenz

Studium: 1969 - 1975 Studium der Humanmedizin Freien Uni-
versität Berlin

Examen: August 1975

Medizinalassistentenzeit:
1.11.1975 bis 31.4.1976 Fa.Schering AG,Berlin
Abt.Pharmakologie
1.7. 1976 bis 31.10.1976 Jüdisches Krankenhaus
Berlin, Innere Abteilung
1.1.1977 bis 31.4.1977 Königswarter Kranken-
haus Berlin, Chirurgische Abt.

Assistenzärztin:
1.5.1977 bis 30.4.1978 Königswarter Kranken-
haus, Chirurgische Abt.
1.7.1978 bis 31.10.1978 Bürgerhaushospital,
Innere Abteilung

1.11.1978 bis 31.10.1981 Städt.Krankenhaus
Spandau, I.Innere Abteilung

1.11.1981 bis 30.6.1982 Sozialpsychiatrischer
Dienst Gesundheitsamt Neukölln

1.7.1982 Niederlassung als Praktische Ärztin in Berlin

